

O RECEPTOR COLINÉRGICO(*)

DR. RICHARD J. KITZ (**)

DR. JAMES ROBERTS (***)

AP2362

Nesta revisão procura-se individualizar o conceito de receptor, os métodos de sua localização e a natureza das membranas celulares. Discutem-se os trabalhos de diversos investigadores para isolamento e identificação do receptor colinérgico.

É importante lembrar periodicamente que as alterações nas funções celulares produzidas por drogas (substâncias) e medidas pelos fisiologistas — como alterações na pressão arterial, na tensão intra-ocular, na motilidade gástrica, na contração uterina, etc. — são o resultado direto de reações químicas. Todas as drogas têm o seu órgão de “descarga” e para produzirem seus efeitos tem de reagir com alguns componente subcelular deste órgão para iniciar as reações químicas que produzam alterações na atividade celular, portanto na função do órgão. Determinadas células contêm compostos que estão adaptados especialmente para atrair e, após, reagir com compostos estranhos que nós chamamos de drogas. Estes constituintes celulares especializados são chamados receptores. Embora sua existência tenha sido descrita como virtualmente auto-evidente, na verdade, nenhum receptor foi ainda isolado e caracterizado. Muitos autores escrevem e conferencistas discutem sobre receptores alfa, beta, pulmonares, por distensão, adrenérgicos, colinérgicos etc. como se muito se soubesse sobre sua localização precisa, sua constituição química e seus níveis moleculares de atividade. Não deveríamos ficar desiludidos, porque pouco pode ser entendido sobre a maneira fundamental, em nível molecular, quando faltam conheci-

(*) Com auxílio do USPHS Grant GM 15904-04.

(**) Professor Henry Isayah Dorr da Universidade de Harvard e Anestesiologista Chefe do Hospital Geral de Massachusetts, Boston, EE.UU.

(***) Pesquisador associado da Escola de Medicina de Harvard e Assistente-Residente do Hospital Geral de Massachusetts.

mentos esclarecedores sôbre a natureza química e as características do próprio receptor. Os defeitos genéticos são melhores compreendidos, hoje em dia, devido ao soberbo trabalho dos biólogos moleculares. Do mesmo modo, o nosso conhecimento sôbre as funções das drogas aumentará muito quando tivermos um grau similar de conhecimento sôbre a natureza do receptor.

! Na discussão que se segue, serão definidos têrmos, explorados os métodos de localização dos receptores nos tecidos, revista a natureza das membranas e finalmente serão discutidos os trabalhos atuais sôbre o isolamento do receptor colinérgico.

O conceito de que as drogas reagem com constituintes celulares especializados foi sugerido em 1878 por Langley. Ele havia notado que a atropina antagonisa a salivacão induzida por pilocarpina, no gato, escreveu então "Nós podemos, penso, sem muito risco, asseverar que há alguma substância ou substâncias nas terminações nervosas ou nas células glandulares que, tanto com a atropina como com a pilocarpina, são capazes de formar compostos. Sob esta assertiva então, os compostos com atropina ou pilocarpina são formados de acôrdo com alguma lei, na qual são fatores, sua massa relativa e com afinidade química, para a substância".

Mas foi somente em 1910 que Paul Ehrlich apresentou a palavra "receptor". Foi ele que simultâneamente introduziu o conceito de complementaridade sugerindo que os receptores são grupamentos químicos que iniciam respostas biológicas pelas combinações com constituintes complementares de outras moléculas. Sua definição de um receptor é "aquêlo grupamento de combinações da molécula protoplasmática ao qual se une um grupamento estranho, quando introduzido". A visão de Ehrlich foi bastante profunda uma vez que ele reconheceu que as interações de alguns receptores de drogas envolviam ligações covalentes, e outras reações, devido a fácil reversibilidade, provávelmente envolvendo diferentes tipos de forças. Ele escreveu, "se podem ser introduzidos no organismo animal, alcalóides, aminas aromáticas, antipiréticos ou anilinas fixadoras, torna-se uma questão fácil, po meio de água, élcool ou reatores, remover tôdas essas substâncias rápida e fácilmente dos tecidos". Ele intendeu que a morte dos tripanossomas tratados com arsênico resultava da ligação covalente do arsênico com um grupamento sulfhídrico que é essencial para a viabilidade do tripanosoma. Talvez a maioria das drogas reajam com seu receptores através de forças de ligações não covalentes.

Uma das principais características de um receptor é sua especificidade — a capacidade para o reconhecimento das

moléculas apropriadas (e sua reação com elas) e a rejeição de outras. Só este fato, é uma forte evidência para a existência de receptores de drogas, mas sua confirmação provém de experiências com drogas que têm estereo-someros ótica-mente ativos. Estes compostos são como se fossem a imagem ao espelho, um do outro, e apresentam propriedades químicas e físicas idênticas (exceto a atividade ótica) e ainda assim apresentam uma potência biológica bastante diferente. Numerosas drogas têm isomeros dextro e levo rotatórios que diferem em potência. Exemplos básicos incluem a morfina, atropina, adrenalina e alguns agentes colinesterásicos.

Embora Langley tenha sugerido em primeiro lugar que as drogas obedecem a lei da ação das massas, A. J. Clark estendeu o conceito, indicando que a reação de uma droga com o receptor poderia ser melhor interpretada como tendo dois componentes principais: a ligação da droga com o receptor que por sua vez é seguida pela atividade. Ele escreveu, "a ação da acetilcolina depende pelo menor de dois fatores separáveis, primeiro, a fixação da droga por certos receptores e segundo, o poder de produzir sua ação após a fixação". E. J. Ariëns sugeriu os termos "afinidade" para o componente ligação e "atividade intrínseca" para o componente ativo. O conceito de "eficácia" logo substituiu "atividade intrínseca" o que sugere que existem diferentes segmentos do receptor que devem ser ocupados pela droga para produzir a resposta máxima.

Quando uma droga reage com um receptor, pelo menos dois tipos de resultados são possíveis: a atividade normal da célula pode ser retardada ou parada, ou a atividade pode ser iniciada ou acelerada. Estas considerações dão surgimento aos termos "antagonista" e "agonista", "inibidor de receptor" e "ativador de receptor"; respectivamente. O curare é um antagonista e a succinilcolina um agonista com relação ao receptor colinérgico; o propranolol é um inibidor de receptor enquanto que o isoproterenol é um ativador de receptor, com relação ao receptor adrenérgico beta.

Antes que possamos discutir o receptor colinérgico é necessário compreender a natureza das membranas de modo geral, uma vez que supõe-se que o receptor colinérgico seja um constituinte altamente especializado da membrana pós-sináptica. As membranas biológicas contêm moléculas que têm uma função intrínseca à sua natureza, tais como as enzimas; mas elas também constituem uma parte da estrutura maior: a célula em si. As membranas são talvez um exemplo simples de moléculas dispostas para formar uma estrutura que, em casos específicos, é suficiente para desempenhar funções especializadas, tais como o transporte de moléculas através a mem-

brana plasmática. Atualmente, há um interesse considerável na química das membranas e uma controvérsia também considerável em relação com sua organização. A maioria das membranas celulares animais se compõe de lípidios (a maior parte, fosfolípidios) e proteínas (a maior parte, em função estrutural e enzimática).

Os dados obtidos com medidas físicas, químicas e medidas de permeabilidade das membranas de células animais levaram Daniellie e Dazse, em 1935, a sugerir um esquema que tem sido a base de todos os trabalhos subsequentes neste assunto. Seu modelo de membrana consiste de uma camada interna de fosfolípidio envolvida por duas camadas de proteínas. Sugeriram eles que os grupos das cadeias laterais das proteínas ionizadas estão viradas para o meio externo polar enquanto que os componentes de ácidos graxos dos lípidios estão localizados no interior hidrofóbico da membrana. Visualizaram estes componentes como estando unidos entre si por ligações iônicas entre os grupos ionizados das proteínas e lípidios. Conceitos atuais modificaram um pouco esta concepção, assinalando um amplo papel para as forças hidrofóbicas. Os lípidios, provavelmente estão unidos uns aos outros por forças hidrofóbicas entre os ácidos graxos e por sua vez os lípidios se unem as proteínas por meio de forças hidrofóbicas entre seus componentes de ácidos graxos e as porções não-polares das proteínas. Outro esquema mostra a membrana organizada na forma de complexos de lipoproteínas que se sucedem, isto é, uma forma de mosaícos formados por suas unidades similares de lipoproteínas.

Com estas considerações básicas, em mente, voltamos agora ao receptor colinérgico. Por definição este receptor é complementar a acetilcolina e reage com a substância transmissora fisiológica em nível celular. Os resultados da interação entre a acetilcolina e o receptor colinérgico são de dois tipos: sinais e sintomas *muscarínicos* que ocorrem da atividade nos músculos lisos e nas glândulas, enquanto que, as ações *nicotínicas* são secundárias a interações transmissor-receptor, na função neuromuscular e ganglionar. Classicamente, a atropina inibe a resposta muscarínica, ao passo que o curare previne a atividade colinérgica. Assim, a acetilcolina, a substância transmissora, é um agonista para ambos receptores muscarínicos e nicotínicos (ambos são colinérgicos) mas a atropina é um antagonista do receptor muscarínico enquanto que o curaro funcione de modo similar no receptor nicotínico. No resto desta discussão estaremos nos referindo ao receptor colinérgico na junção mioneural. A maioria dos farmacologistas concorda em que este receptor seja uma parte especializada da membrana pós-sináptica da junção mioneural em-

bora esta visão clássica tenha sido constatada ocasionalmente, principalmente por Nachmansohn. Quando a acetilcolina reage com o receptor colinérgico, a membrana pós-sináptica é despolarizada propagando assim o impulso através a fenda sináptica. Coincidindo com a queda do potencial de repouso da membrana, isto é, com a despolarização, há um movimento simultâneo de íons sódio e potássio, de acordo com seus gradientes eletroquímicos. O potássio sai da célula e o sódio entra; as correntes iônicas resultantes despolarizam a membrana pós-sináptica. Após a acetilcolina sair do receptor, o fluxo de íons sódio e potássio reverte e as características da membrana ficam restabelecidas. Os agonistas imitam a acetilcolina e iniciam o fluxo de íons sódio e potássio, enquanto que os antagonistas evitam esta ocorrência. Os poros através os quais se movimentam os íons sódio e potássio são chamados de ionoforos. É claro que os ativadores e inibidores de receptor influenciam o comportamento destes ionoforos e qualquer conceituação deve levar isto em consideração.

A localização de um receptor, nos tecidos depende frequentemente de técnicas de fixação histoquímica e autoradiográficas. Muitos estudos pioneiros usando esta metodologia foram realizados pelo laboratório de farmacologia do Dr. Peter Waser na Universidade de Zürich. A técnica de fixação histoquímica para a localização de anticolinesterase tissular foi desenvolvida pelo Dr. George Koelle na Universidade de Pennsylvania. Esta técnica depende do uso de um substrato relativamente específico para acetilcolinesterase que quando reage com outros agentes resulta numa fixação química preta que se deposita na área onde o substrato é hidrolizado pela enzima. No método autoradiográfico são empregados compostos com carbono marcado (C^{14}) que são relativamente específicos para o receptor colinérgico. Após uma preparação adequada, os tecidos são expostos a filmes de Raios X por tempos que variam de alguns dias até a meses. Os filmes são então revelados sob condições normais e as áreas escuras dos filmes nas regiões musculares com placa terminal são medidas com microdensitômetros sensíveis para medir quantitativamente as concentrações da substância radiotiva. A preparação muscular mais frequentemente usada é o diafragma do camundongo porque a sua pequena espessura permite uma difusão rápida de diferentes substâncias e íons da solução que banha e também porque as regiões da placa terminal estão concentradas de forma circular em torno do centro tendinoso do diafragma. Isto torna possível a autoradiografia. Os compostos marcados mais frequentemente usados nesses estudos são a curarina, a toxiferina, a dimetil tubocura-

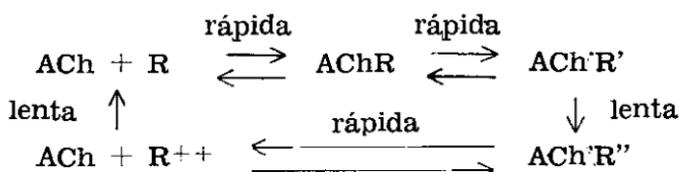
rina o decametônio, a muscarona, carbacol, a acetilcolina e o deisopropililfluorofosfato (DPS). Usando esta técnica, Waser verificou na membrana pós-sináptica de uma placa terminal do diafragma do camundongo que os receptores colinérgicos aí localizados fixam um máximo de $4-5 \times 10^6$ moléculas de curare. Tomando por base que uma molécula de curare se fixa a um receptor, o valor acima representa a concentração de receptores numa placa terminal. Quando foi usado decametônio marcado, foi observada uma distribuição muito mais difusa das placas terminais, cada placa fixando 7×10^7 moléculas, com a fixação de droga individual na região próxima a placa terminal. Foi notado também que o curare não é deslocado pelo decametônio. Estes dados indicam que os agentes bloqueadores neuromusculares despolarizantes e não despolarizantes podem perfeitamente ser fixados por receptores colinérgicos diferentes.

Foi usado DFP marcado para medir a quantidade de locais ativos de anticolinesterase situados na membrana pós-sináptica da placa terminal. Foram fixadas 2×10^7 moléculas ao DFP por placa terminal o que sugere que a concentração da enzima na região da placa terminal se aproxima deste valor. Waser interpreta este dado como indicativo de que os receptores colinérgicos são diferentes dos centros ativos de acetilcolinesterase. Além disso, os receptores para os inibidores (curare) e ativadores (decametônio) diferem em quantidade e distribuição. Waser conceitua o receptor colinérgico como estando situado em torno de um ionoforo (poro) através o qual ocorre o fluxo de íons sódio e potássio durante a despolarização. Ele sugere que os antagonistas diquaternários ou moléculas grandes, como o curare bloqueiam o fluxo de íons por obstrução dos poros. As moléculas agonistas como a do decametônio abrem os ionoforos devido a sua fixação na membrana que circunda o poro. No estado de repouso, o poro está fechado. É presumível que ocorra uma alteração de configuração induzida na proteína da membrana que, por sua vez, altera o tamanho do poro, permitindo o fluxo de íons.

Experiências adicionais em tecido denervado revelaram que a membrana pré-sináptica degenera dentro de vários dias após a denervação. Entretanto, o curare marcado se mantém fixado na membrana pós-sináptica remanescente, por muitos meses. Presume-se daí que o principal local de ação do curare seja na região pós-sináptica, mais do que na terminação nervosa.

Thesleff descreveu uma condição do receptor colinérgico, não fisiológica e induzida por droga, chamada de "dessensibilização do receptor". Se, após a despolarização, a concentra-

ção de acetilcolina exposta ao receptor fôr mantida, o estado de despolarização é substituído por um processo gradativo de repolarização. Os receptores colinérgicos sofreram uma alteração desconhecida de modo que ficam refratários à atividade despolarizante da acetilcolina e o potencial da membrana se recupera. Em condições clínicas supõe-se que ocorre este tipo de "bloqueio por dessensibilização", após uso prolongado ou excessivo de agentes anticolinesterásicos ou agentes bloqueadores neuromusculares despolarizantes, tais como a succinilcolina e o decametônio. Estas reações podem ser representadas na forma de uma equação sugerida por Thesleff:



Os termos tem a seguinte definição: ACh, — acetilcolina; R, receptor; ACh.R, complexo intermediário inativo; ACr'R'', complexo de receptor-acetilcolina despolarizado; ACh'R'' complexo receptor de acetilcolina dessensibilizada; R'', receptor dissensibilizado. Em condições fisiológicas normais somente ocorrem as equações da parte superior, porque a acetilcolina é rapidamente destruída pela colinesterase. Contudo se esta enzima fôr inibida por agentes anticolinesterásicos, então o receptor despolarizado fica exposto continuamente a altas concentrações de acetilcolina resultando presumivelmente num receptor dessensibilizado. Os agentes bloqueadores neuromusculares podem provocar um fenômeno de dessensibilização similar.

Qual é a natureza do receptor colinérgico? Vamos considerar os constituintes primários da matéria: água, carboidratos, lipídios e proteínas. A priori, regeita-se a água devido à sua natureza ubíqua não específica. Os carboidratos estão geralmente relacionados com a produção de energia, muito mais que com atividades fisiológicas delicadas. Os lipídios não são considerados "componentes ativos" mas sim uma forma de armazenar energia. Por outro lado, as proteínas são os componentes ativos e constituintes essenciais aos músculos e nervos. Somente as proteínas parecem oferecer a possibilidade de uma adequação química suficiente para serem responsáveis pela versatilidade, especificamente, e pelos tipos de atividade essenciais para um receptor. Não é provável que as proteínas exerçam esta função isoladamente mas que sejam

o constituinte essencial numa associação complexa com água, sais e lipídios.

Os detalhes moleculares relacionados com a reação entre a acetilcolina e seu receptor são desconhecidos. Muitas teorias, entretanto, tem sido propostas. Nachmansohn sugeriu que o evento seja primariamente intracelular: a acetilcolina seria liberada de sua forma conjugada por um impulso nervoso. Esta acetilcolina livre reagiria em nível intracelular com o receptor colinérgico na terminação nervosa, produzindo uma alteração na sua conformação que, por sua vez, induz, a permeabilidade da membrana aos íons sódio e potássio. Seriam os íons ou a corrente gerada na área pré-sináptica que despolarizam a membrana pós-sináptica. Esta teoria nega o papel da acetilcolina como substância transmissora e não é amplamente aceita.

Uma extensão mais detalhada dos conceitos de modificações induzidas na conformação molecular foi proposto por Watkins, que sugere a existência de áreas especiais (descontinuidades polares) da membrana pós-sináptica que são especialmente vulneráveis à acetilcolina. Sua hipótese é de que o transmissor desloca a cabeça polar de um lipídio apropriado, combinando-se com o complexo lipídio-protéico, induzindo assim uma alteração de conformações que por sua vez altera a permeabilidade. "Estas modificações conformacionais e a liberação de grupos anionicos tanto lipídicos como protéicos podem facilmente abrir os canais seletivos de cationes e liberar a permeabilidade da região aos íons sódio e potássio".

Durrell sugeriu que a ação principal da acetilcolina é na porção lipídica da membrana e não na protéica. Ele postula que a acetilcolina altera a permeabilidade da membrana por um "efeito direto e contínuo na velocidade de clivagem fosfodiesterásica de um ou mais fosfolipídios. Provavelmente porque os fosfolipídios estão unidos a proteína da membrana sua alteração pode induzir a alterações de conformação desta de modo que a porção iontoforética do receptor torna-se permeável aos íons sódio e potássio. A característica própria da hipótese de Durrell é a de que os elementos principais são os lipídios e que a hidrólise de ligações covalentes é o evento central e não simplesmente alteração macromolecular.

Antes que possamos aceitar como fato uma destas teorias ou mesmo outras hipóteses, o próprio receptor deve ser isolado e caracterizado.

O isolamento, a purificação e caracterização do receptor colinérgico depende primariamente de dois fatores principais: 1) uma fonte de material que seja econômica. em explorar, e 2) um método para a solubilização do material do receptor

de modo que suas propriedades fisiológicas possam ser testadas. A natureza provê o pesquisador com um tecido rico em macromoléculas colinérgicas. Esta fonte principal é o órgão elétrico do peixe elétrico, principalmente o *Electrophorus electricus* e o *Torpedo marmorata*. Os tecidos destes peixes tem abundante inervação colinérgica e aparelhos sinápticos indistinguíveis das funções mioneurais dos mamíferos. A forma principal usada para identificar o receptor colinérgico tem sido com o transmissor fisiológico, acetilcolina, os análogos da acetilcolina (muscarona), os antagonistas colinérgicos, curare, galamina, diversos compostos diazônicos que são conjugados por covalência ao receptor e, mais recentemente, a d-bungarotoxina, um veneno de cobra.

Em 1960, Ehrenpreis descreveu o isolamento e identificação da proteína do receptor colinérgico do tecido elétrico do *Electrophorus electricus*. Investigações mais avançadas desta proteína revelaram propriedades inadequadas de conjugação e não homogeneidade. Chagas e col em 1958 relataram a separação de uma macromolécula conjugada a galamina do tecido elétrico, que foi identificada como um mucopolissacarídeo e os estudos subsequentes revelaram que sua conjugação era inespecífica trazendo sérias dúvidas quanto a identificação deste mucopolissacarídeo como sendo o receptor colinérgico.

Changeux sugere que a acetilcolinesterase está intimamente relacionada com o receptor colinérgico na membrana pós-sináptica. Sugere mais que a unidade receptor-esterase (protômero) é um equilíbrio entre dois estados conformacionais diferentes $P \rightleftharpoons D$, onde P representa o estado do protômero quando a membrana pós-sináptica está polarizada e D representa o estado despolarizado. O potencial de membrana (e portanto a permeabilidade) é determinado pela fração do protômero que está no estado D de transição. As atividades dos agonistas e antagonistas são descritas em termos de estabilização diferencial tanto das formas D ou P. Esta teoria de transição alostérica foi modelada após a descrição dos enzimas reguladores por Monod, Wyman e Changeux.

Nos últimos dez anos, o grupo de DeRobertis, de Buenos Ayres vem relatando estudos sistemáticos sobre os protolipídios do órgão elétrico do *Torpedo* e do *Electrophorus*. Um protolipídio aparentemente homogêneo foi isolado com clorofórmio e metanol e depois estudado em sua afinidade com acetilcolina, hexametônio e um composto deazônico todos marcados. Este proteolipídio foi extraído de uma membrana da qual foi removida previamente a acetilcolinesterase com cloreto de sódio molar. Estes dados são "interpretados como evidência conclusiva de que a acetilcolinesterase e o receptor colinérgico são duas macromoléculas diferentes, presentes na

membrana do electroplax mas tendo propriedades de solubilidade muito diferentes". Experiências adicionais foram relatadas nas quais a interação entre o material proteolípídico e atropina e haxametônio foram feitas com técnicas de luz refletida, polarização de fluorescência e microscopia eletrônica. Ficou demonstrado que a associação das moléculas proteolípídicas com estas drogas causa um aumento no tamanho da partícula, provavelmente devido a agregação de moléculas proteolípídicas. Estudos em microscopia eletrônico confirmaram estes dados e revelaram que estas drogas induzem as moléculas de proteolípídios do receptor a se agregarem e se alinharem em formas geométricas.

Conforme foi mencionado na introdução a demonstração de conjugação específica entre uma macromolécula e uma determinada droga é uma evidência insuficiente quando tomada isoladamente para identificar a macromolécula como sendo o receptor. É necessária uma outra demonstração indicando que a conjugação tanto previna as alterações de permeabilidade (inibidores do receptor, antagonistas) como induza tais atividades (ativadores do receptor, agonistas). O grupo de DeRobertis introduziu seu receptor proteolípídico dentro de uma membrana com duas camadas lipídicas que separava duas soluções de sal e tampão. Pela aplicação de diferentes voltagens através a membrana, eles puderam medir a condutividade. A membrana artificial com o material proteolípídico receptor, "reagiu a adição de acetilcolina com um aumento considerável e transitório na condutividade. Tal alteração é bloqueada pela d-tubocurarina". Estes resultados indicam que uma resposta semelhante a de um receptor pode ser produzida no proteolípídio contido em membranas artificiais.

O grupo chefiado por R. B. O'Brian na Universidade de Cornell extraiu uma determinada fração solúvel do Torpedo electroplax. O material foi encubado, em experiências separadas, com 18 preparações enzimáticas diferentes. O componente conjugável macromolecular provavelmente é uma fosfolipoproteína porque somente a tripsina, a quimiotripsina, e a fosfolipase C reduziram a atividade de conjugação para a muscarona. Foi relatada evidência adicional indicando que a acetilcolinesterase não foi responsável pela conjugação da muscarona. Deve ser lembrado que o material de fosfolipoproteína foi extraído e estudado em água. Assim, é provável que não seja o mesmo material descrito por DeRobertis porque este foi isolado numa solução clorofórmio-metanol.

Lee e col. na Universidade Nacional de Taiwan isolaram a d-bungarotoxina do veneno de uma serpente daquela região, e mostraram que a toxina atua como um inibidor

irreversível dos receptores colinérgicos na junção mioneu-ral de vertebrados. Este efeito foi prevenido pela d-tubocurarina, indicando uma especificidade para o receptor colinérgico. Changeux, Kasei e Lee, em Paris e Miladi, Molinoff e Potter em Londres relataram importantes experiências utilizando esta toxina.

O grupo de Changeux descobriu que a bungarotoxina bloqueia a resposta do electroplax ao agonista, carbamilcolina. Este efeito foi descrito como sendo irreversível. Num sistema in vitro foi mostrado que a bungarotoxina inibe a permeabilidade das membranas preparadas do electroplax. Nesta preparação ficou demonstrado que a toxina reage de uma maneira irreversível e estoquiométrica de modo que a quantidade necessária para o bloqueio é diretamente proporcional à quantidade de material de membrana existente. Estas ações foram evitadas pela d-tubocurarina e decametônio. A concentração de toxinas usadas nessas experiências não teve efeito na atividade da acetilcolinesterase, mas o número de locais receptores foi aproximadamente igual ao número de locais catalíticos de acetilcolinesterase no tecido. Estes dados sugerem que a bungarotoxina foi conjugada especificamente com o receptor colinérgico nas preparações solúveis e o sistema pode ser usado para isolar a macromolécula receptora.

O grupo de Londres dirigido por Miladi marcou a bungarotoxina com iôdo 131 radioativo. Este material foi usado para estudar a conjugação da toxina ao receptor colinérgico do tecido elétrico do Torpedo. A conjugação da toxina marcada é dependente de tempo o que indica a formação de um conjugado covalente. A velocidade de conjugação não foi alterada pelo agente anticolinesterásico, fisostigmina, mas diminuiu em presença de curare e carbamilcolina. Estes dados sugerem uma conjugação específica da toxina ao receptor colinérgico. O material foi tornado solúvel tratando-o com triptina X100, um detergente, e purificado por centrifugação gradual de densidade e cromatografia. O receptor marcado foi claramente separado da acetilcolinesterase. O peso molecular da proteína receptora é aproximadamente 80.000 e em agregados vão ao valor de 500.000 a 2.000.000. Outros dados indicam que a proteína receptora pode ser um tetramero de sub-unidades, cada uma pesando 80.000. É de interesse o fato de que o material foi extraído numa solução de cloreto de sódio 0.4 molar e assim deve ser diferente do material descrito por DeRobertis. Pode, entretanto, estar relacionado com as macromoléculas isoladas por O'Brian.

É óbvio que são necessárias experiências adicionais. Em particular, quanto ao material tornado solúvel isolado por Miladi (e também O'Brian), deve ser demonstrado que con-

trola a permeabilidade aos íons sódio e potássio. Mas parece bastante claro que se obteve muito progresso e que as experiências definitivas necessárias para isolar e caracterizar o receptor colinérgicos estão, fora de dúvida, sendo realizadas.

SUMMARY

THE CHOLINERGIC RECEPTOR

In this article terms are defined, methods of receptor localization in tissues explored, the nature of membranes is reviewed and the current work on cholinergic receptor isolation is discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. Kitz R J, Karis J H and Ginsburg S — A study in vitro of new short acting, non-depolarizing neuromuscular blocking agents. *Biochem Pharmacology*, 18:871-881, 1969.
2. Karis J H, Kitz R J, and Nastuk W L — The use of in-vitro techniques in the development of new neuromuscular blocking agents. *Anesthesiology*, 29:199-201, 1968.
3. Ginsberg S, Kitz R J and Savarese J J — The neuromuscular blocking activity of a new series of quaternary n-substituted esters. *British Journal of Pharmacology*, 42: 1971 (In press).