



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA
MOLECULAR**

**Interacciones Inhibidoras Cruzadas entre los
Receptores *Cys-Loop* en Neuronas Mientéricas**

Tesis que presenta

Luz María García Hernández

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

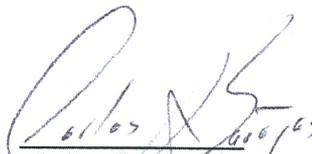
Dr. Carlos Barajas López

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2007

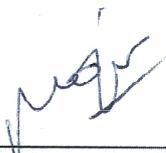


Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Interacciones Inhibidoras Cruzadas entre los Receptores *Cys-Loop* en Neuronas Mientéricas**”, presentada para obtener el grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Luz María García Hernández** y aprobada el **3 de 07 de 2007** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Carlos Barajas López
Director de la tesis



Dr. Rubén López Revilla
Asesor de la tesis



Dr. Sergio Casas Flores
Asesor de la tesis



Dr. Elia B. Narajo Rodríguez
Asesor de la tesis



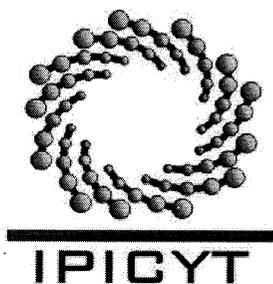
Dr. Eduardo Calixto
Asesor de la tesis



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Neurobiología de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Carlos Barajas López.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. de registro: 176114.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 012 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 6 días del mes de julio del año 2007, se reunió a las 16:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Secretario	IPICYT
Dr. Carlos Barajas López	Sinodal	IPICYT
Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez	Sinodal externo	UNAM
Dr. Jaime Eduardo Calixto González	Sinodal externo	INPRF

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Luz María García Hernández

sobre la Tesis intitulada:

Interacciones Inhibidoras Cruzadas entre Receptores Cys-Loop en Neuronas Mientéricas

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Carlos Barajas López

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:10 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 6 días del mes julio de 2007.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


L.C.C. Ivonne Lizbeth Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



A mis padres Sara y Daniel, que siempre están conmigo y me apoyan en todo momento.

A Sergio Israel por su paciencia y amor.

A mis hermanos: Patricia, Daniel, José Manuel, Juan Carlos y por supuesto a Alex.

A mis sobrinos Pablo, Sofía y Andrea

Al Dr. Carlos por su confianza, apoyo, por todo lo que me ha enseñado, y sobretodo por su amistad.

A Rosy que además de ayudarme profesionalmente ha sido una gran amiga.

Al Dr. Rubén López Revilla, gracias por su confianza.

A la Dra. Elia Naranjo Rodríguez, sinceramente gracias por su amistad y todo su apoyo.

Al laboratorio de Sinaptogenética: Marce, Fer, Raquel, Paco, Esri, Andrómeda, Paco B y Coco. Gracias por los buenos momentos.

A mis amigas: Rebe, Clau, Cyt, Jacqueline, Mireya, Lupita, Denisse, Liz y Alma, gracias por estar en todo momento.

Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada

A mi supervisor de tesis Dr. Carlos Barajas López por sus enseñanzas

A los asesores de esta tesis por sus comentarios y sugerencias:

Dr. Rubén López Revilla

Dr. Sergio Casas Flores

Dra. Elia Naranjo Rodríguez

Dr. Eduardo Calixto

A Rosa Espinosa Luna por la realización de los cultivos celulares

A la Dra. Marcela Miranda Morales y al M.C. Fernando Ochoa Cortés por las aportaciones realizadas a este trabajo

Contenido

CAPITULO	PAGINA
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de Examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de Figuras	ix
Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xiii
I. Introducción General	1
II. Antecedentes Generales	
a. Doctrina Neuronal	2
b. Sistema Nervioso Visceral	5
c. Potenciales de Acción y Comunicación Sináptica	6
d. Receptores Iónicos Activados por Ligando de la Superfamilia <i>Cys-Loop</i>	11
d.1. Receptores Canal Activados por el GABA	14
d.2. Receptores Canal Activados por la Serotonina	16
d.3. Receptores Canal Activados por la Acetilcolina	17
e. Interacciones entre LGIC	18
III. Planteamiento del Problema	23
IV. Hipótesis	24
V. Objetivos	25
VI. Materiales y Métodos	26
VII. Resultados	
a. Propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de las corrientes de célula completa inducidas por el GABA, la ACh y la 5-HT.	32
b. Las corrientes inducidas por el GABA, la ACh y la 5-HT no son aditivas.	37
c. Cinética de las corrientes inducidas por la aplicación simultánea de los agonistas.	40
d. La aplicación simultánea de los agonistas desensibiliza los receptores GABA _A y los 5-HT ₃ y los GABA _A y los nACh.	46
e. Mecanismos pre-receptor y artefactos técnicos como el origen de la oclusión de corriente.	52
f. Papel de la fosforilación de proteínas y el Ca ²⁺ intracelular en la oclusión de corriente.	53
g. La oclusión de corriente requiere la activación de receptores con un flujo iónico neto a través de ellos.	54

h.	La corriente de oclusión presente entre los receptores GABA _A y los 5-HT ₃ es dependiente de la concentración.	55
VIII.	Discusión	65
a.	La inhibición cruzada entre los receptores <i>Cys-Loop</i> es mediada por la interacción directa entre estos receptores.	67
b.	Las corrientes inducidas por la aplicación simultánea de ambos agonistas son llevadas a través de ambos receptores <i>Cys-Loop</i> .	67
c.	Implicaciones funcionales para las interacciones entre estos receptores.	68
IX.	Referencias	71
X.	Anexo a. Protocolo del Cultivo Primario de Neuronas Mientéricas.	76
	Anexo b. Miranda-Morales M, García-Hernández LM , Ochoa-Cortes F, Espinosa-Luna R, Naranjo-Rodríguez EB and Barajas-Lopez C. Cross-talking between 5-HT(3) and GABA(A) receptors in cultured myenteric neurons. <i>Synapse</i> 61: 732-740, 2007.	78
	Anexo c. García-Hernández LM , Miranda-Morales M, Ochoa-Cortes F, Espinosa-Luna R, and Barajas-Lopez C. Inhibitory interactions between nACh and GABA _A receptors in myenteric neurons.	86

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Representación esquemática de una neurona multipolar.	4
2	Los canales de calcio están concentrados en la unión neuromuscular en regiones de la terminal nerviosa presináptica opuestos a los grupos de receptores en la membrana postsináptica.	13
3	Representación esquemática de la hipótesis de sobreposición de canales propuesta por Nakazawa en 1994 para explicar la oclusión de las corrientes inducidas por ATP y ACh.	20
4	Modelo de las interacciones inhibitoras entre receptores canal.	21
5	Diagrama de flujo de la metodología utilizada para la realización del cultivo primario de neuronas del plexo mientérico.	27
6	Representación esquemática de la cámara de registro y del sistema de aplicaciones rápidas de las soluciones experimentales	29
7	Registro típico de una corriente entrante inducida por ACh.	30
8	Las corrientes inducidas por GABA (I_{GABA}), ACh (I_{ACh}) y 5-HT (I_{5-HT}) no son mediadas por receptores $GABA_A$, nACh y $5-HT_3$, respectivamente.	34
9	Las corrientes inducidas por GABA (I_{GABA}), ACh (I_{ACh}) y 5-HT (I_{5-HT}), no son aditivas, revelando una oclusión de corriente.	38
10	La oclusión de las corrientes ocurre tan rápidamente como la activación de los receptores.	42
11	La cinética de inactivación de las corrientes inducidas por ambos agonistas es diferente de la cinética de las corrientes individuales.	43
12	Análisis de la cinética de la caída de las corrientes inducidas por GABA (I_{GABA}), ACh (I_{ACh}) y 5-HT (I_{5-HT}).	48
13	La aplicación simultánea de dos agonistas induce corrientes mediadas por los dos receptores ionotrópicos esperados.	49
14	Las interacciones inhibitoras entre los receptores $GABA_A$ y nACh y entre los $GABA_A$ y los $5-HT_3$ requieren la presencia de receptores funcionales.	57
15	Los iones calcio y la actividad de la fosforilación de proteínas no son requeridos para la oclusión de corriente.	59
16	La oclusión de corriente requiere de un flujo iónico neto a través de los receptores.	61
17	La oclusión de corriente no es observada a baja concentración de los agonistas.	63

Abreviaturas

5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
5-HT₃	Receptor serotoninérgico tipo 3
ACh	Acetilcolina
AMPA	Acido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-propiónico
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca²⁺	Iones calcio
Cl⁻	Iones cloruro
Cs⁺	Iones cesio
GABA	Acido γ -aminobutírico
GABA_A	Receptor gabaérgico tipo A
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanesulfónico
K⁺	Iones potasio
LGIC	Ligand-gated ion channel, receptores regulados por ligando
mM	milimolar
ms	Milisegundos
mV	Milivoltios
Na⁺	Iones sodio
nA	Nanoamperes
nAChR	Receptores nicotínicos activados por acetilcolina
NMDA	N-metil-D-aspartato
P2X	Receptores purinérgicos
PPADS	Piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNE	Sistema Nervioso Entérico
TRP	Potencial de Receptor Transitorio

Resumen

Interacciones Inhibidoras Cruzadas entre Receptores *Cys-Loop* en Neuronas Mientéricas

El ácido γ -aminobutírico (GABA), la acetilcolina (ACh) y la serotonina (5-HT) son conocidos por jugar una función importante como neurotransmisores por abrir directamente los receptores ionotrópicos GABA_A, nACh y 5-HT₃ en la membrana postsináptica. A estos se les conoce también como receptores activados por ligando y son parte de la superfamilia *Cys-Loop*. Varios miembros de esta superfamilia mantienen interacciones inhibitoras cruzadas con los receptores P2X. En este trabajo, caracterizamos las interacciones inhibitoras entre los receptores nativos GABA_A y 5-HT₃ y entre los receptores GABA_A y nACh en neuronas mientéricas de intestino delgado de cobayo. Las corrientes de célula completa inducidas por la aplicación de altas concentraciones de GABA+ACh ($I_{\text{GABA+ACh}}$) o de GABA+5-HT ($I_{\text{GABA+5-HT}}$) indujeron corrientes menores que la suma de las corrientes individuales, lo cual reveló una oclusión de corriente. Esta oclusión es observada tan pronto como los receptores son activados y la $I_{\text{GABA+ACh}}$ o la $I_{\text{GABA+5-HT}}$ son llevadas a través de los receptores GABA_A y nACh, o a través de los receptores GABA_A y 5-HT₃, respectivamente.

La oclusión requiere de la activación máxima de al menos uno de estos receptores. Las propiedades farmacológicas y cinéticas de $I_{\text{GABA+5-HT}}$ o de $I_{\text{GABA+ACh}}$ indican que son llevadas a través de ambos receptores GABA_A y 5-HT₃ o de GABA_A y nACh, respectivamente. 5-HT no afectó la I_{GABA} en neuronas en las cuales: i) los receptores 5-HT₃ no estaban presentes, ii) en

presencia de tropisetron (un antagonista de los receptores 5-HT₃), iii) después de desensibilizar el receptor 5-HT₃ o iv) al potencial de inversión de I_{5-HT}. Similarmente, GABA no afectó la corriente mediada por los receptores 5-HT₃ en neuronas en las cuales: i) los receptores GABA_A no estaban presentes, ii) en presencia de bicuculina (antagonista de los receptores GABA_A), iii) después de desensibilizar el receptor GABA_A, o iv) al potencial de inversión de I_{GABA}. Hallazgos similares se encontraron para la oclusión entre I_{GABA} + I_{ACh}, indicando que la oclusión requiere de la presencia de canales funcionales. La oclusión de corriente está aún presente en ausencia de Ca²⁺, cuando los experimentos se realizaron a baja temperatura (10-11°C) y después de usar un inhibidor de cinasas (estaurosporina). Estos resultados son consistentes con el modelo de inhibición cruzada entre los receptores GABA_A y 5-HT₃ y entre los receptores GABA_A y nACh. Nuestro estudio demuestra interacciones entre miembros de la familia *Cys-Loop*, lo cual podría sugerir la existencia de interacciones entre la misma clase de receptores iónicos activados por ligando (p.e. receptores nACh). Esta hipótesis podría implicar que este tipo de interacciones desempeñan un papel importante en la señalización neuronal de muchas sinapsis.

Palabras Clave: Receptores *Cys-Loop*, receptores nACh, receptores GABA_A, receptores 5-HT₃, sistema nervioso entérico, neuronas, neurotransmisores, sinapsis, patch-clamp, guinea-pig.

Abstract

Cross-Inhibitory Interactions between *Cys-Loop* Receptors in Myenteric Neurons

γ -Aminobutyric acid (GABA), acetylcholine (ACh) and serotonin (5-HT) play an important function as neurotransmitters by directly activating GABA_A, nACh and 5-HT₃ receptors on the postsynaptic membrane. These receptors are ligand-gated channels and belong to the *Cys-Loop* superfamily. Various members of this superfamily of receptors maintain cross-inhibitory interactions with P2X receptors. We characterize the inhibitory interactions between native GABA_A and 5-HT₃ receptors and between GABA_A and nACh receptors of myenteric neurons from the guinea-pig small intestine. Whole-cell currents induced by the application of high concentrations of GABA+ACh ($I_{\text{GABA+ACh}}$) or GABA+5-HT ($I_{\text{GABA+5-HT}}$) induced mixed currents that were smaller than the addition of individual currents, which reveals a current occlusion. This occlusion is observed as soon as channels are activated and $I_{\text{GABA+ACh}}$ or $I_{\text{GABA+5-HT}}$ are carried through both GABA_A and nACh channels or through GABA_A and 5-HT₃ channels, respectively.

Current occlusion requires maximal activation of at least one of these receptors. Kinetic and pharmacological properties of $I_{\text{GABA+5-HT}}$ or $I_{\text{GABA+ACh}}$ indicated that they are carried through both GABA_A and 5-HT₃ channels or GABA_A and nACh channels, respectively. 5-HT did not affect I_{GABA} in neurons in which: i) 5-HT₃ channels were not present, ii) in the presence of tropisetron (5-HT₃ receptor antagonist), iii) after 5-HT₃ receptor desensitisation or iv) at the $I_{\text{5-HT}}$ reversal potential. Similarly, GABA did not affect 5-HT₃ mediated

currents in neurons in which: i) GABA_A channels were not present, ii) in presence of bicuculline (GABA_A receptors antagonist), iii) after GABA_A receptor desensitisation, or iv) at the I_{GABA} reversal potential. Similar findings were found for the occlusion between I_{ACh} and I_{GABA}, indicating that the occlusion requires of the presence of functional channels. Current occlusion was still present in absence of Ca²⁺, when experiments were performing at low temperature (10-11°C), after adding to the pipette solution a protein kinase inhibitor (staurosporine). These results are consistent with a model of cross-inhibition between GABA_A and 5-HT₃ and between GABA_A and nACh receptors. Our study demonstrates interactions between members of the *Cys-loop* family, which would suggest the existence of inhibitory interactions between the same kind of ligand-gated ion channels (e.g., nACh receptors). This hypothesis would imply that these type of interactions play a major role in neuronal signaling in many if not all synapses.

Keywords: *Cys-Loop* receptors, nACh receptors, GABA_A receptors, 5-HT₃ receptors, enteric nervous system, neurons, neurotransmitters, synapse, patch-clamp, guinea pig.

I. Introducción General

Las neuronas poseen receptores iónicos que al ser activados por un ligando específico pueden abrirse y generar corrientes iónicas a través de la membrana, lo cual modifica las propiedades eléctricas celulares y son la base fundamental de una buena parte de la comunicación interneuronal. Estos receptores se conocen en la literatura como receptores ionotrópicos o canales iónicos activados por ligando (LGIC; por sus siglas en inglés). La apertura de estos receptores se efectúa mediante un cambio tridimensional en la proteína que se inicia cuando se une el ligando, lo cual permite un cambio selectivo en la permeabilidad de la membrana a iones específicos que altera el potencial de membrana de la neurona.

Las corrientes eléctricas generadas pueden ser registradas experimentalmente con una alta precisión mediante la técnica de *Patch clamp* en su modalidad de fijación de voltaje. Utilizando esta técnica, se ha encontrado que la apertura de receptores ionotrópicos mantiene interacciones directas capaces de modular la actividad de receptores vecinos. Interacción que parece existir entre canales P2X y varios receptores de la superfamilia *Cys-Loop*. En el presente estudio encontramos que este tipo de interacciones existe también entre los receptores *Cys-Loop* nativos de las neuronas mientéricas del cobayo.

II. Antecedentes Generales

a. Doctrina Neuronal

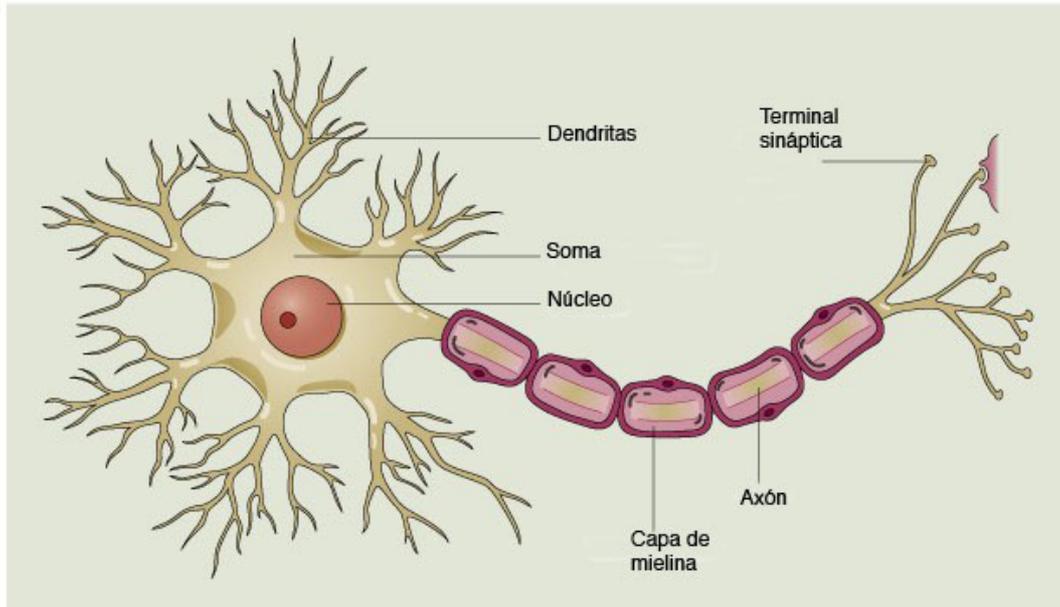
Desde principios del siglo XIX se reconoce que los organismos están formados por elementos fundamentales denominados células. Sin embargo, hasta los últimos años de dicho siglo fue cuando los neurocientíficos coincidieron en que el tejido nervioso también está formado por esas unidades fundamentales, en este caso llamadas neuronas (Hammond 1996; Kandel 2000).

En la segunda mitad del siglo XIX, prevalecían dos corrientes, la de los reticulistas, quienes creían que el sistema nervioso se encontraba formado por una continua e ininterrumpida red de fibras nerviosas y la segunda, la de los neuristas, quienes defendían que el sistema nervioso estaba formado por un gran número de simples unidades celulares interconectadas entre sí, las neuronas. La lucha entre ambas corrientes fue definida por la invención de una técnica de tinción tisular desarrollada por Camilo Golgi en 1880, curiosamente uno de los defensores principales de la corriente reticulista. Esta técnica permitió la tinción de las fibras nerviosas mediante una reacción de dicromato de plata, mostrando la visualización microscópica de la neurona completa, incluyendo el cuerpo celular y sus dos principales tipos de procesos: las dendritas y el axón (Hammond 1996; Kandel 2000). Esta técnica fue explotada al máximo por el neuroanatomista español Santiago Ramón y Cajal en 1888, cuyo ingenio permitió la demostración de que el sistema nervioso es una intrincada red de células discretas y que la comunicación entre ellas era mediante conexiones especializadas que en

1897 Sherrington llamó sinapsis (Zimmermann 1993; Hammond 1996; Kandel 2000).

En la actualidad, está bien establecido que el tejido nervioso está formado por elementos celulares discretos y células gliales. Las neuronas son células altamente especializadas que han perdido su capacidad reproductiva, mientras las células gliales son en realidad un conjunto de células que tienen diversas funciones, algunas de ellas todavía desconocidas (Kandel 2000).

Las neuronas son células especializadas en la generación y el procesamiento de señales eléctricas para lo cual están organizadas en circuitos. La figura 1 es una representación esquemática de una neurona multipolar, el tipo más común. El cuerpo neuronal o soma es la porción de mayor diámetro y contiene el núcleo y la mayor parte de los organelos citoplasmáticos. Dos tipos de procesos nerviosos se desprenden del cuerpo neuronal. El axón es uno de ellos, el cual suele ser particularmente largo, mantiene su diámetro constante y no contiene ribosomas. Hay un solo axón por neurona el que permite la transmisión de señales eléctricas sin decremento desde el soma hasta la terminal axónica. Los otros procesos son más cortos y su diámetro disminuye conforme se alejan del soma, estos procesos son conocidos como dendritas. La mayoría de las entradas sinápticas, se reciben en las dendritas donde los axones de otras neuronas terminan.



© 2000 John Wiley & Sons, Inc.

Figura 1. Representación esquemática de una neurona multipolar. Varios procesos se desprenden del cuerpo neuronal (soma) siendo el axón el de mayor diámetro. Las dendritas son los procesos más cortos y disminuyen su diámetro a medida que se alejan del soma. Diagrama modificado de www.usm.maine.edu/psy/broida/101/neuron.JPG.

Desde el punto de vista funcional, las neuronas pueden clasificarse en sensoriales, interneuronas y motoras. Las primeras llevan información de la periferia hacia el sistema nervioso y su cuerpo neuronal se encuentra en ganglios sensoriales periféricos. Las neuronas motoras llevan información del sistema nervioso a los órganos efectores como los músculos, las glándulas, etc. Las interneuronas son células cuyos axones terminan dentro del mismo centro neuronal y permiten la modulación de las neuronas que salen de dicho centro (Kandel 2000).

Las sinapsis pueden ser químicas o eléctricas. Las primeras usan moléculas (neurotransmisores), las cuales son liberadas en la terminal axónica y actúan en la membrana (postsináptica) de la célula receptora. En

las sinapsis eléctricas, el citoplasma de las dos células se comunica mediante canales especializados, conocidos como uniones comunicantes. Estas uniones tienen una baja resistencia eléctrica y permiten que las señales eléctricas de una neurona se propaguen a la segunda (Zimmermann 1993; Hammond 1996 ; Kandel 2000).

b. El sistema Nervioso Visceral

El sistema nervioso tiene dos componentes anatómicos, el sistema nervioso periférico y el central. El sistema nervioso periférico está compuesto por dos divisiones, la motora y la sensorial. La división motora (eferente) del sistema nervioso está formada por la porción visceral y la somática.

El sistema nervioso visceral motor, también conocido como sistema nervioso autónomo, regula las funciones de todas las vísceras incluyendo el tono vascular, la secreción salival, la secreción y motilidad del tracto gastrointestinal, etc. La división somática motora regula la actividad de los músculos esqueléticos y se encarga de funciones como el movimiento y la postura corporal, la respiración, la masticación, etc. (Kandel 2000).

La división aferente (sensorial) también tiene dos componentes, el visceral y el somático, si bien sus características anatómicas y funcionales no siempre son tan marcadas como en la división motora. Las fibras sensoriales viscerales nos informan con respecto a la presión arterial, el pH sanguíneo, la distensión visceral, etc. Las fibras sensoriales somáticas nos informan de la postura de las extremidades y del tronco, de la presión, las vibraciones, la temperatura, etc. (Kandel 2000).

También se reconocen áreas del sistema nervioso central que integran fundamentalmente funciones viscerales (p.e. el hipotálamo) o somáticas (p.e. la corteza primaria motora) (Kandel 2000).

El Sistema Nervioso Entérico (SNE) es una porción del sistema nervioso visceral periférico y está conformado por un extenso grupo de neuronas situadas en la pared de la mayor parte del tracto gastrointestinal. Controla las funciones del tubo digestivo desde la porción media del esófago hasta el ano. El SNE contiene neuronas sensoriales, interneuronas y motoneuronas que son responsables de varias respuestas reflejas intrínsecas al intestino. Sin embargo, también está bajo control externo siendo regulado por el sistema nervioso central y el sistema nervioso endocrino. El SNE incluye el plexo mientérico (plexo de Auerbach), que controla la contracción y relajación del músculo liso intestinal y el plexo submucoso (plexo de Meissner), que controla las funciones de absorción y secreción del epitelio gastrointestinal, el flujo sanguíneo local y las respuestas neuroinmunes (Galligan 2002). El SNE juega un papel importante en la homeostasis al regular la absorción de agua y nutrientes, así como la expulsión de los desechos alimenticios (Kandel 2000).

c. Potenciales de Acción y Comunicación Sináptica

Las señales nerviosas entre el soma y la terminal axónica se les conoce como potenciales de acción, los cuales son cambios rápidos de tipo todo o nada del potencial de membrana (Hammond 1996; Kandel 2000). Los potenciales de acción se inician por una despolarización local de la membrana que induce una corriente entrante mayor que la corriente saliente

generando así, una despolarización en cadena durante la cual el potencial de membrana de ser negativo (~ -70 mV) pasa a valores positivos (~ 30 mV). Después de lo cual se repolariza hasta sus valores control, pasando transitoriamente por un periodo de hiperpolarización. El potencial de acción típico de una neurona dura $\sim 2-3$ ms y requiere de la activación de canales de Na^+ dependientes de voltaje durante la despolarización y de canales de K^+ sensibles al voltaje durante la fase de repolarización.

El potencial de acción se conduce a través del axón, rápidamente y sin decremento en su amplitud, así la señal nerviosa llega a la terminal sináptica iniciándose la comunicación sináptica.

Las sinapsis pueden ser de dos tipos químicas y eléctricas. En las eléctricas la comunicación se realiza a través de canales intercelulares (uniones comunicantes) que se caracterizan por tener una baja resistencia eléctrica, permitiendo así, el movimiento de iones entre el citoplasma de una neurona a otra. Por tal razón, cuando las uniones comunicantes están abiertas las neuronas pre y postsinápticas se acoplan eléctricamente. Estos canales intercelulares permiten el paso de moléculas de hasta 1200 D (p.e. diacil glicerol, trifosfato de inositol, cAMP), lo cual lleva a un acoplamiento bioquímico parcial.

La transmisión sináptica química es unidireccional, es decir, que se lleva a cabo del elemento presináptico al postsináptico. Esto se debe a la especialización de las estructuras que conforman este tipo de sinapsis, las cuales incluyen tres elementos: la terminal presináptica, la hendidura sináptica y la membrana postsináptica. Este tipo de transmisión es

unidireccional, es decir, que se lleva a cabo del elemento presináptico al postsináptico.

La terminal presináptica es una dilatación del axón con un alto grado de especialización. En ella se encuentran almacenadas vesículas repletas del neurotransmisor. La membrana presináptica de muchas sinapsis, contiene tiras con una alta densidad de canales de Ca^{2+} llamadas zonas activas. Estos canales son dependientes del voltaje y permiten el influjo de Ca^{2+} durante la llegada del potencial de acción a la terminal axónica. Las zonas activas, contienen un conjunto de proteínas algunas de las cuales son sensores de los Ca^{2+} , mientras que otras permiten anclar y fusionar las vesículas sinápticas a la membrana citoplasmática, lo que lleva a la liberación del neurotransmisor a la hendidura sináptica. Este proceso se conoce como exocitosis. Las sinapsis con este tipo de características generan potenciales sinápticos extremadamente rápidos (~ 1 ms) y breves (~ 30 ms) como los que ocurren en sinapsis glutamatérgicas y colinérgicas. Muchas de las sinapsis que tienen zonas activas contienen otras vesículas sinápticas llenas de neuropéptidos. Estas vesículas se funden a la membrana citoplasmática fuera de las zonas activas. Los neuropéptidos que liberan funcionan como neuromoduladores pero pueden mediar potenciales sinápticos muy lentos los cuales pueden durar varios minutos.

La zona activa no existe en sinapsis como las monoaminérgicas (Hammond 1996; Kandel 2000), las cuales se caracterizan por generar potenciales sinápticos más lentos (~ 1 s).

La membrana postsináptica de las sinapsis que generan potenciales rápidos se caracteriza por la presencia de una zona electrodensa (densidad

postináptica), la cual corresponde a la región donde los receptores postsinápticos se encuentran anclados. La distribución de estos receptores no es al azar sino que hay una estricta relación entre las zonas activas del elemento presináptico y los receptores postinápticos (Hammond 1996), como se discute posteriormente. Esto asegura una activación rápida y efectiva de los receptores postsinápticos cuando se libera el neurotransmisor.

La elevación de la concentración del neurotransmisor, requerida para la activación de los receptores postsinápticos, ocurre únicamente durante la exocitosis ya que este es removido rápidamente de la hendidura sináptica mediante varios mecanismos. Así, el neurotransmisor puede ser degradado por enzimas específicas localizadas estratégicamente en la hendidura sináptica o bien mediante su captura por las membranas sinápticas o células gliales vecinas. La concentración del neurotransmisor disminuye también por su difusión fuera de la hendidura sináptica. Por ejemplo, el GABA de la hendidura sináptica es recapturado por la célula presináptica o por células gliales y también es degradado mediante la GABA transaminasa generando el semialdehído succínico el cual es inactivo sobre los receptores al GABA.

En las sinapsis químicas los potenciales sinápticos suceden por la activación de receptores que modifican el flujo iónico a través de la membrana plasmática. Estos receptores pueden estar acoplados a proteínas G o tirosina cinasa (receptores metabotrópicos) o directamente a canales iónicos (receptores ionotrópicos). Ambos tipos de receptores pueden ser activados por el mismo neurotransmisor. La neurotransmisión rápida (ms) es mediada por receptores ionotrópicos, la lenta (segundos a minutos) es

mediada por receptores metabotrópicos. Los efectos de los neuromoduladores son mediados por estos últimos receptores.

Los receptores metabotrópicos modulan los canales iónicos sólo indirectamente, es decir, las funciones de receptor y efector son llevados a cabo por medio de dos moléculas diferentes. Este receptor consiste en dos familias: los receptores acoplados a proteínas G y los receptores tirosina cinasa. El receptor acoplado a proteína G está asociado a un componente efector por una proteína unida al nucleótido guanina o a una proteína G. Esta familia contiene los receptores α - y β -adrenérgicos, los receptores a acetilcolina muscarínicos, los receptores GABA_B, algunos receptores a glutamato y a 5-HT, receptores para neuropéptidos, así como receptores olfatorios y a rodopsina.

La activación del componente efector del receptor acoplado a proteína G requiere la participación de varias proteínas. Típicamente el efector es una enzima que produce un segundo mensajero difundible. Estos segundos mensajeros disparan una cascada bioquímica, ya sea por la activación de proteínas cinasas específicas que fosforilan una gran variedad de proteínas celulares o por la movilización de iones Ca²⁺ de almacenes intracelulares. En algunos casos, la proteína G o los segundos mensajeros pueden actuar directamente sobre un canal iónico.

El dominio citoplasmático de un receptor tirosina cinasa es una enzima que se fosforila a sí misma y a otras proteínas en los residuos de tirosina. Dicha fosforilación permite que se una al receptor y de este modo active otras proteínas, incluyendo otras cinasas que son capaces de actuar sobre canales

iónicos. Los receptores a tirosina cinasas son típicamente activados por hormonas y factores de crecimiento (Kandel 2000).

En los receptores ionotrópicos o también conocidos como receptores iónicos activados por ligando (por sus siglas en inglés, LGIC), el receptor y el canal son parte de la misma proteína y el canal se abre cuando el neurotransmisor se une a su sitio específico. Algunos de los neurotransmisores que activan LGIC son la acetilcolina (receptores nACh), el ácido γ -aminobutírico (receptores GABA_A), el ATP (P2X) y la serotonina (receptores 5-HT₃). El efecto postsináptico de la apertura de estos receptores depende del potencial de membrana, de la permeabilidad iónica del receptor, y de la concentración de los iones dentro y fuera de la neurona. Como el resto del sistema nervioso, las funciones de las neuronas entéricas dependen de la comunicación sináptica y los LGIC juegan un papel primordial en la comunicación rápida entre neuronas entéricas.

d. Receptores Iónicos Activados por Ligando de la Superfamilia *Cys-Loop*

El microscopio electrónico reveló la presencia de una especialización particular en la membrana postsináptica, caracterizada por una electrodensidad mayor. Estudios posteriores demostraron que esta electrodensidad se genera por la alta densidad de LGIC. Estudios de imágenes fluorescentes muestran que estos receptores postsinápticos (p.e. nACh) están distribuidos en listones moleculares que se orientan en la misma dirección que los canales de calcio de la membrana presináptica (Figura 2). Es importante mencionar que estos canales de calcio se localizan contiguos a

los sitios donde el neurotransmisor es liberado. Es decir, la mayor densidad de LGIC se encuentra frente a los sitios que liberan el neurotransmisor (Kandel 2000). Esto convierte a las sinapsis químicas en dispositivos altamente sensibles. Los LGIC también pueden estar localizados en la membrana presináptica y en áreas no directamente relacionadas con la sinapsis (Hammond 1996).

Los LGIC son proteínas constituidas por varias subunidades, las cuales forman un poro central acuoso. Los sitios de unión al ligando están presentes en los dominios extracelulares. Cuando el ligando o el neurotransmisor se une a su receptor, la proteína cambia su conformación y pasa a un estado en el que el poro acuoso es permeable a iones. El movimiento iónico genera una corriente de magnitud proporcional al número de receptores abiertos y la dirección de esta corriente depende del tipo de iones y de si el movimiento iónico es hacia el citoplasma o hacia el exterior de la membrana. Por convención, se le considera corriente entrante al movimiento de cargas positivas hacia el interior de la célula o de cargas negativas hacia el exterior, mientras que se considera corriente saliente al movimiento de cargas positivas al exterior o de negativas hacia el interior.

Los LGIC pueden existir en al menos tres estados, normalmente están cerrados en ausencia de ligando, y cuando éste se une a su sitio receptor le tomará ~ 0.02 ms para entrar al estado abierto, y una vez que el ligando se disocia el canal pasará nuevamente al estado cerrado. Otro estado de estos receptores se observa en presencia continua de concentraciones relativamente altas del ligando y se conoce como inactivación (desensibilización). En este estado los receptores canal no se abren a pesar

de que el ligando esté unido a su sitio receptor. Un canal inactivado sólo puede ser reactivado hasta que el ligando se disocie del sitio receptor y regrese a su estado cerrado (Barry and Lynch 2005).

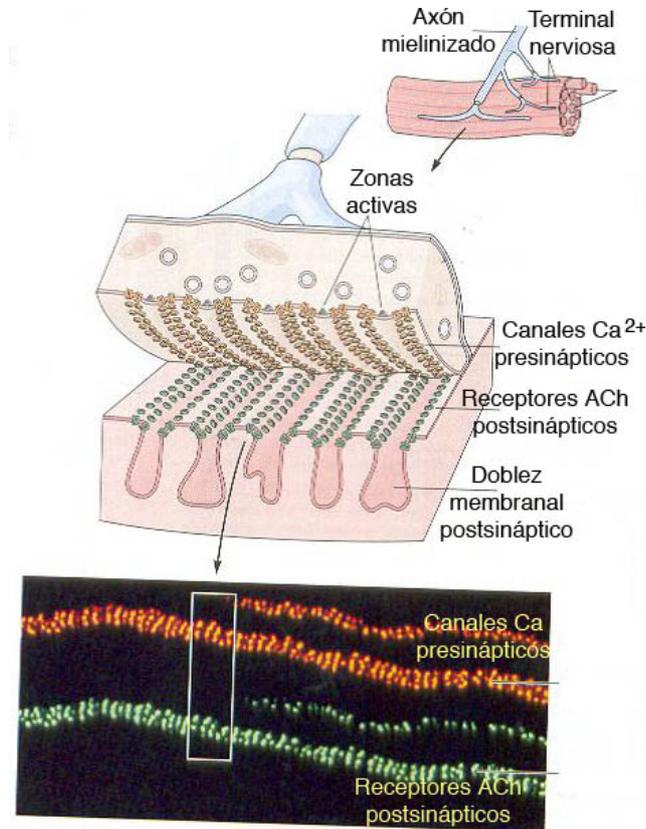


Figura 2. Los canales de calcio están concentrados en la unión neuromuscular en regiones de la terminal nerviosa presináptica opuestos a los grupos de receptores a ACh en la membrana postsináptica. La imagen de fluorescencia muestra a los canales de Ca^{2+} presinápticos en rojo, después de marcarlos con rojo de Texas acoplado a la toxina de caracol marino que se une a los canales de Ca^{2+} . Los receptores a ACh postsinápticos están marcados en verde con α -bungarotoxina, la cual se une selectivamente a los receptores a ACh. Las dos imágenes normalmente están sobrepuestas pero han sido separadas para mayor claridad. Los patrones de marcaje para ambas sondas están casi en el mismo registro, indicando que la zona activa de la neurona presináptica está casi perfectamente alineada con la membrana postsináptica que contiene alta concentración de receptores a ACh. (Modificado de (Kandel 2000)).

Los LGIC son clasificados en cuatro superfamilias, la de los *Cys-Loop*, los receptores a glutamato (NMDA, N-metil-D-aspartato; AMPA, ácido α -

amino-3-hidroxi-5-metiloxazole-4-propiónico y kainato), los canales TRP (potencial de receptor transitorio) y los canales activados por trifosfato de adenosina (ATP; P2X) (Connolly and Wafford 2004).

Los miembros de la superfamilia *Cys-Loop* son diversos y su activación es responsable de potenciales sinápticos excitadores e inhibidores dependiendo de si su permeabilidad es a cationes (p.e. nAChR, 5-HT₃) o permeables a aniones (p.e. GABA_A, receptores glicinérgicos) (Connolly and Wafford 2004).

Los receptores *Cys-Loop* poseen estructura similar. Los receptores están formados por cinco subunidades. Cada subunidad está constituida por un dominio amino terminal extracelular, cuatro dominios transmembranales (M1-M4) y un dominio carboxilo terminal extracelular. También tienen un dominio largo intracelular entre M3 y M4 (Jensen y *col.* 2005), el cual ha sido implicado en la facilitación de la interacción entre el receptor y la matriz intracelular. Característicamente, la subunidad α que conforman estos receptores contiene dos residuos de cisteína en el dominio donde se une el ligando y se sabe que forma un enlace disulfuro (Kao and Karlin 1986). Después de unirse el ligando al sitio de unión, el poro interno es abierto mediante un cambio conformacional permitiendo el flujo de iones.

d.1. Receptores Canal Activados por GABA

El GABA es un neurotransmisor cuyas acciones son fundamentalmente inhibitoras, en el sentido que activa receptores que disminuyen la probabilidad de que se produzcan potenciales de acción, ya sea porque disminuye la excitabilidad neuronal o bien porque inhibe la liberación de

neurotransmisores excitadores (Zimmermann 1993; Hammond 1996). Existen tres tipos de receptores importantes activados por GABA, los GABA_A, GABA_B y los GABA_C (Zimmermann 1993).

Los GABA_A son receptores canal permeables a cloruro (Cl⁻). Debido a que la concentración de este ión es mayor afuera que adentro de la neurona, la activación de estos receptores genera hiperpolarizaciones en las neuronas postsinápticas llamadas potenciales postsinápticos inhibitorios.

Los receptores GABA_B son de tipo metabotrópicos, están asociados a proteínas G y afectan la excitabilidad neuronal mediante la generación de segundos mensajeros. Las respuestas generadas por estos receptores son lentas. La activación de estos receptores puede inhibir la liberación de neurotransmisores en algunas sinapsis excitadoras. Algunas sinapsis inhibitorias usan solamente un tipo de receptor activado por GABA, mientras que otras tienen ambos tipos (Zimmermann 1993; Conley 1996; Hammond 1996).

Los receptores GABA_A tienen sitios de unión para fármacos como benzodiazepinas (diazepam y clordiazepóxido que se unen a las subunidades α y β de estos receptores), barbitúricos (fenobarbital que es un sedante hipnótico que se une a la subunidad γ) y neuroesteroides (como la alopreganolona, DHEA, DHEAS, sulfato de pregnenolona e incluso el THDOC), están involucrados en varios procesos sinápticos, como el aprendizaje, memoria y protección neuronal, etc., importantes en la fisiología neuronal (Conley 1996; Hammond 1996).

El canal central de los receptores GABA_A está formado por un arreglo heteropentamérico de subunidades polipeptídicas de tres familias α 1 a 6, β 1

a 4, $\gamma 1$ a 4, $\delta 1$ a 3 (Zimmermann 1993; Conley 1996; Hammond 1996). Dentro de estas familias se han identificado variantes adicionales de un solo miembro de subunidades: ϵ , θ y π . La subunidad ρ solamente ha sido encontrada en la retina y en el timo, debido a que el receptor en esta estructura es funcionalmente distinto y farmacológicamente diferente del receptor GABA_A, se le ha distinguido como GABA_C.

La subunidad $\gamma 2$ no sólo incrementa la sensibilidad del receptor al GABA, sino que se piensa que la mayor parte de los receptores sinápticos contienen esta subunidad (Essrich y *col.* 1998). Esta subunidad también es esencial para la sensibilidad del receptor a los moduladores alostéricos como el zinc y las benzodiazepinas. Mutaciones heterocigotas sin sentido en la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABA_A producen una mezcla de convulsiones generalizadas febriles y afebriles (Baulac y *col.* 2001; Wallace y *col.* 2001). Además, mutaciones de esta subunidad afectan a pacientes con convulsiones de ausencia (Wallace y *col.* 2001).

d.2. Receptores Canal Activados por Serotonina

Los receptores 5-HT₃ son receptores canal presentes en algunas líneas celulares neurales, y en neuronas periféricas y centrales (Kilpatrick y *col.* 1987, 1988; Barnes y *col.* 1990; Jones y *col.* 1992; Krantis 2000). La clonación de una subunidad funcional del receptor 5-HT₃ (5-HT_{3A}) en el ratón, la rata y el cerebro humano confirmó que este receptor es miembro de la superfamilia *Cys-Loop* (Maricq y *col.* 1991; Hope y *col.* 1993), el cual media la transmisión rápida excitadora en el sistema nervioso central (Sugita y *col.*

1992). Los receptores 5-HT₃ están constituidos por una combinación de cinco subunidades (5-HT_{3A-E}), aunque sólo se conocen las secuencia de aminoácidos de tres de ellas (5-HT_{3A-C}) (Reeves and Lummis 2002). Receptores homoméricos pueden estar formados de subunidades 5-HT_{3A} y receptores heteroméricos pueden ser también obtenidos por la combinación de 5-HT_{3A} con una segunda subunidad conocida de esta subfamilia (5-HT_{3B}). Receptores no funcionales resultan de la expresión de solamente subunidades 5-HT_{3B} (Maricq y *col.* 1991; Hope y *col.* 1993).

Los receptores 5-HT₃ están localizados en las terminales mesolímbicas dopaminérgicas y modulan la liberación de dopamina (DA), una acción implicada con el reforzamiento positivo de los efectos de las drogas de abuso (Johnson 2004).

d.3. Receptores Canal Activados por Acetilcolina

Los receptores nicotínicos activados por acetilcolina (nAChR) están formados por cinco subunidades organizadas alrededor de un canal catiónico central (Grutter and Changeux 2001; Karlin 2002). Diecisiete subunidades del receptor nACh han sido clonadas (α 1- α 10, β 1- β 4, γ , δ y ϵ) (Grutter and Changeux 2001; Karlin 2002). Estas subunidades pueden combinarse formando varios tipos de nAChR, incluyendo arreglos homoméricos y heteroméricos. Un simple nAChR heteromérico neuronal, tiene dos sitios de unión a ACh formados entre la interfase de una subunidad α con la subunidad β , en el dominio extracelular cerca del N-terminal de M1(Karlin 2002). Los nAChR son expresados tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. En la periferia, los nAChR musculares son también

encontrados en la unión neuromuscular, mientras que los nAChR neuronales pueden ser detectados en células gangliónicas o también en células no neuronales (Sargent 1993; Wessler y *col.* 1999). En el cerebro, los nAChR juegan múltiples papeles en la transducción de señales, datos que han sido reportados apoyan su papel en la transmisión sináptica rápida (Zhang y *col.* 1993; Futami y *col.* 1995; Hefft y *col.* 1999), en la transmisión axo-axónica (Lena y *col.* 1993) y en la modulación de la liberación presináptica del transmisor (Role 1992; Wonnacott 1997).

La nicotina es el principal componente psicoactivo en el tabaco, y es el responsable de las propiedades de reforzamiento que conducen a la adicción tenaz y a la alta incidencia de recaída de los que dejan el tabaco.

La alta afinidad de la nicotina por el nAChR subtipo $\alpha 4\beta 2$, y su relativa abundancia en el cerebro, conduce a asumir que este podría ser el principal blanco mediando las propiedades psicoactivas de la nicotina. Así, por ejemplo en el tratamiento crónico de roedores con nicotina conduce a una sobre-regulación en el número de $\alpha 4\beta 2$ en el nAChR sitios de unión en el cerebro (Gentry and Lukas 2002), simulando los hallazgos observados *post-mortem* en cerebros de fumadores (Benwell y *col.* 1988; Breese y *col.* 1997).

e. Interacciones entre LGIC (por sus siglas en inglés)

En la actualidad los mecanismos de integración sináptica del sistema nervioso no son del todo claros, por lo que la información que nos pueda brindar la interacción entre los receptores nos ayudará a comprender mejor la actividad sináptica del sistema nervioso en general. Varios grupos de investigación hemos mostrado que la activación simultánea de receptores de

diferente familia induce una interacción cruzada entre los receptores involucrados (Nakazawa 1994; Barajas-Lopez y *col.* 1998; Zhou and Galligan 1998).

Existen resultados interesantes sobre la interacción cruzada entre diferentes poblaciones de receptores canal, los cuales median la transmisión sináptica rápida. En particular, aquellas interacciones entre canales P2X y nACh (Barajas-Lopez y *col.* 1998; Boue-Grabot y *col.* 2003), entre los P2X y los 5-HT₃ (Barajas-Lopez y *col.* 2002; Boue-Grabot y *col.* 2003).

Para explicar la interacción cruzada entre canales, Nakazawa en 1994 sugirió que los receptores P2X y los nACh compartían el mismo canal en las neuronas simpáticas de rata (Figura 3). Esta hipótesis de sobreposición o combinación de canales fue basada en el hecho de que la aplicación simultánea del ATP y la ACh induce una corriente ($I_{ACh+ATP}$) menor que la suma ($I_{ACh} + I_{ATP} = I_{Esperada}$) de las corrientes inducidas por la aplicación individual (I_{ACh} y I_{ATP}) de estos agonistas.

En 1998 Barajas-López *et al.*, reportaron resultados similares a los encontrados por Nakazawa, en las neuronas del plexo submucoso, cuando las corrientes se registraron a un potencial de -60 mV. Sin embargo, a +40 mV las corrientes fueron aditivas. A este potencial, la amplitud de la $I_{ACh+ATP}$ no fue diferente a la $I_{Esperada}$, descartando la hipótesis de Nakazawa (Barajas-Lopez y *col.* 1998). Esto último demostró que la I_{ATP} y la I_{ACh} son mediadas por diferentes poblaciones de receptores. Es decir, que varios miembros de la superfamilia *Cys-Loop* mantienen interacciones inhibitoras con receptores P2X.

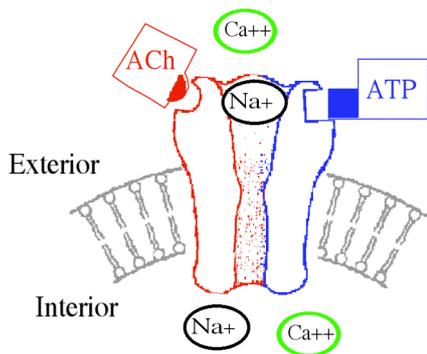
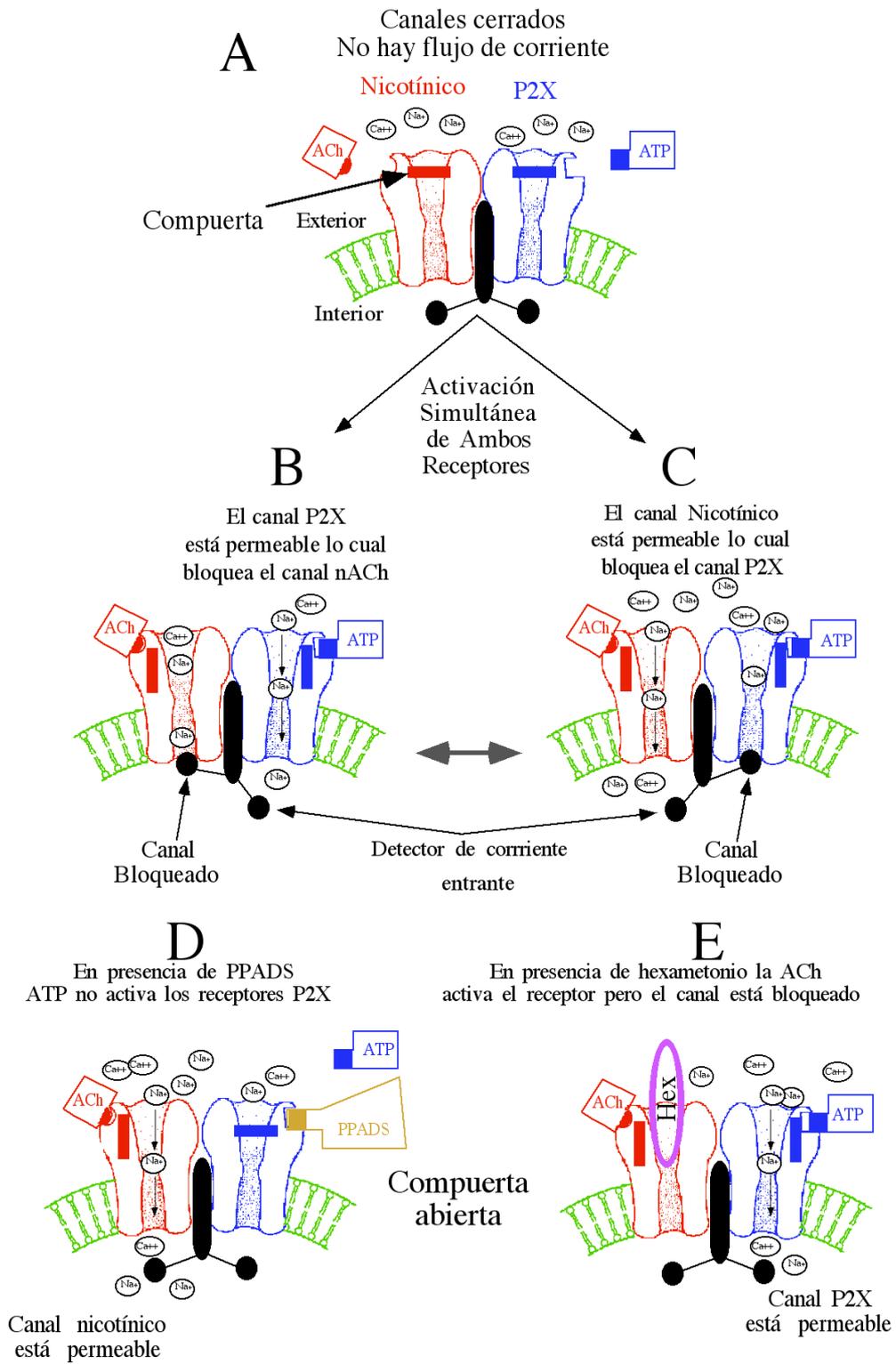


Figura 3. Representación esquemática de la hipótesis de dos receptores compartiendo un solo canal propuesta por Nakazawa en 1994 para explicar la oclusión de las corrientes inducidas por ATP y ACh. Creada por Barajas-López.

En conjunto estas observaciones sugirieron que la oclusión de corriente es mediada por interacciones alostéricas directas entre los LGIC o bien mediante interacciones alostéricas que involucren un estructura (proteína) vecina a estos receptores. Ambas explicaciones asumen que los receptores canal involucrados se encuentran localizados muy cerca uno del otro dentro de la membrana neuronal.

El significado funcional de las interacciones cruzadas entre los receptores del mismo tipo, en este caso los pertenecientes a la superfamilia *Cys-Loop*, nos ayudará a generar hipótesis que nos permitan comprender procesos tan importantes como la modulación sináptica, explicar la citotoxicidad provocada por las altas concentraciones de sus mismos neurotransmisores, de la degeneración neuronal o de la conservación de energía e incluso del control de segundos mensajeros.

Figura 4. Modelo de las interacciones inhibitoras entre receptores canal. A, los receptores están organizados en unidades que poseen al menos un receptor canal de cada tipo. Cuando los receptores son simultáneamente activados, únicamente uno de los dos canales de ésta unidad se abre en un tiempo dado, como se muestra en **B** y **C**. **B,** cuando el influjo iónico es detectado en el canal P2X, este induce el bloqueo del canal nicotínico, a través de un mecanismo que posiblemente involucra las terminales carboxílicas de los canales P2X. **C,** cuando el influjo iónico se detecta en el canal nicotínico se bloquean los canales P2X. La unidad funcional podría cambiar del estado **A** al **B** o viceversa. Diferentes unidades funcionales de una célula dada podrían estar en el estado **A** o **B** de manera fortuita. Este modelo se basa en el hecho de que la cinética de las corrientes inducidas por la aplicación simultánea de los dos agonistas no es explicada únicamente por la cinética de las corrientes individuales, ya que en presencia de PPADS (por sus siglas en inglés; un antagonista de los receptores P2X) $I_{ACh+ATP}$ es similar a I_{ACh} y en la presencia de hexametonio (un bloqueador de los canales nicotínicos) $I_{ACh+ATP}$ es similar a I_{ATP} sola (no mostrado). Diagrama creado por Barajas-López



III. Planteamiento del problema

Se ha mostrado que la activación de los LGIC (por sus siglas en inglés) no es un proceso necesariamente independiente. Así, cuando algunos receptores son simultáneamente activados se muestran interacciones cruzadas entre ellos, ejemplo de estas son las interacciones entre algunos canales nativos P2X con miembros de la superfamilia de receptores *Cys-Loop*. En concreto con receptores nicotínicos (Nakazawa 1994; Barajas-Lopez y col. 1998; Zhou and Galligan 1998), con receptores 5-HT₃ (Barajas-Lopez y col. 2002; Boue-Grabot y col. 2003) y con receptores GABA_A (Sokolova y col. 2001; Karanjia y col. 2006). Li *et al.*, 2003, reportaron por primera ocasión las interacciones entre dos miembros de la superfamilia de receptores *Cys-Loop*, específicamente demostraron la presencia de una interacción inhibitora asimétrica entre los receptores glicinérgicos y los GABA_A, ambos receptores aniónicos. El presente trabajo involucra el estudio de las posibles interacciones inhibitoras entre un receptor catiónico (nACh o 5-HT₃), y el otro aniónico (GABA_A) en neuronas del plexo mientérico.

IV. Hipótesis

Siendo los receptores nACh y los 5-HT₃ estructuralmente similares a los receptores glicinérgicos esperaríamos que los receptores nACh y los 5-HT₃ mantengan interacciones inhibitoras con los receptores GABA_A.

V. Objetivos

1. Estudiar las interacciones inhibitoras entre los receptores canal GABA_A y 5-HT₃ en neuronas del plexo mientérico del cobayo.
2. Caracterizar las interacciones inhibitoras entre los receptores canal GABA_A y 5-HT₃.
3. Investigar las interacciones inhibitoras entre los receptores canal GABA_A y nACh en neuronas del plexo mientérico del cobayo.
4. Caracterizar las interacciones inhibitoras entre los receptores canal GABA_A y nACh.

VI. Materiales y Métodos

Cobayos jóvenes de 150 a 200 g, machos o hembras, fueron sacrificados por decapitación y se extrajo un segmento de 5 cm de yeyuno proximal. Se mantuvo abierto longitudinalmente en solución de Krebs modificada, en mM: 126 NaCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 5 KCl, 25 NaHCO₃, 11 glucosa; gasificada con 95% O₂ y 5% CO₂. La capa mucosa y submucosa de este segmento de intestino fue disecada, se removió la mayoría del músculo circular, quedando el plexo mientérico embebido en el músculo longitudinal.

La preparación fue disociada usando un tratamiento secuencial con dos soluciones enzimáticas, como se ha descrito (Barajas-Lopez y col. 1996), la primera contenía papaína (0.01 mL/mL; activada con 0.4 mg/mL de L-cisteína) y la segunda colagenasa (1 mg/mL) y dispasa (4 mg/mL). Las enzimas fueron removidas usando medio L-15 para lavar y las células fueron sembradas en cubreobjetos redondos cubiertos con colagena estéril de cola de rata. El medio de cultivo contenía 97.5% de medio mínimo esencial, 2.5% de suero de cobayo, L-glutamina 2 mM, penicilina 10 U/mL, estreptomina 10 µg/mL y glucosa 15 mM (Figura 5). Para mayor detalle ver Anexo I.

Se sabe que ACh, GABA y 5-HT modulan canales de potasio en la membrana de neuronas entéricas vía receptores unidos a proteínas-G (Christofi y col. 1997; Barajas-Lopez y col. 2000; Krantis 2000). Con el fin de disminuir la participación de estas corrientes, los experimentos se realizaron en presencia de Cs⁺ (un bloqueador de canales de potasio). Además, las corrientes fueron registradas por la técnica de *Patch-clamp* en su configuración de fijación de voltaje, lo cual también es conocido que descarta

efectos mediados por segundos mensajeros (Gillis y *col.* 1991). Esta configuración se logra después de obtener un gigasello entre la pipeta de cristal y los lípidos que componen la membrana celular (configuración de célula pegada), una vez que se alcanza esta configuración se aplica una ligera succión para romper la membrana que separa el citoplasma del interior de la pipeta, logrando así continuidad entre los componentes (configuración de célula completa). Esto nos ayudó a monitorear los cambios iónicos que nos generan las corrientes que registramos.

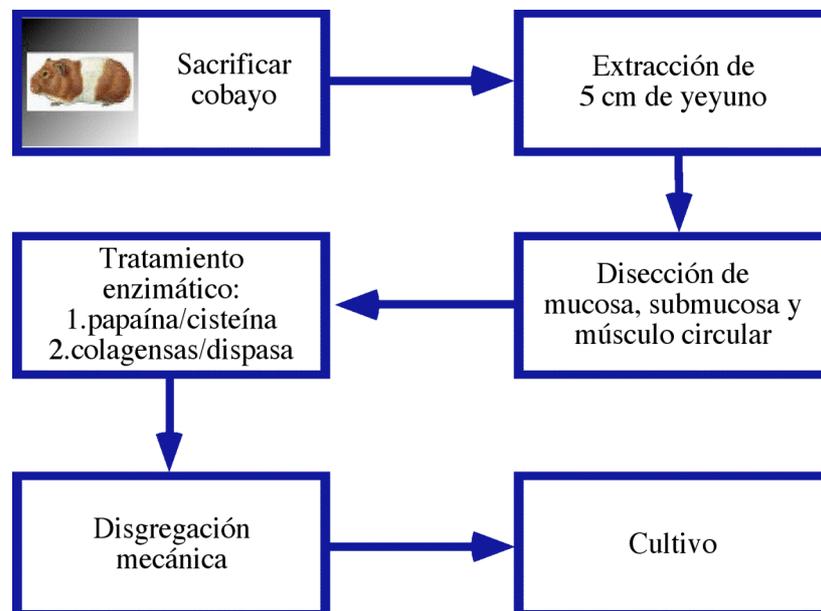


Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología utilizada para la realización del cultivo primario de neuronas del plexo mientérico e intestino delgado de cobayo.

Las corrientes de membrana inducidas por ACh, GABA y 5-HT fueron registradas en cultivo primario de neuronas mientéricas de corto tiempo (2-80 h) con un amplificador Axopatch 1D. Las pipetas de registro se fabricaron utilizando capilares de borosilicato y el estirador de pipetas Narishige.

Posteriormente, fueron pulidas utilizando el microscopio/pulidor Narishige (MF-830) hasta que el diámetro externo de la punta de la pipeta fuera 1.5 a 2.0 μm con una resistencia de entre 1-3 $\text{M}\Omega$. Del 60 al 95% de la resistencia en serie fue compensada en 9 de las 33 neuronas analizadas en las interacciones entre GABA y 5-HT, mientras que entre un 90 a 98% de la resistencia en serie se compensó para 10 de las 26 células analizadas para la interacción GABA y ACh. La dicha compensación no afectó la falta de adición entre I_{GABA} y $I_{5\text{-HT}}$ ni entre I_{ACh} y I_{GABA} (ver Resultados), en la mayoría de los casos la compensación no se realizó por este factor. Excepto cuando otra cosa fuera mencionada el potencial de membrana se mantuvo a -60 mV. Las soluciones utilizadas, tuvieron la siguiente composición en mM. Dentro de la pipeta: CsCl 160, EGTA 10, HEPES 5, NaCl 10, ATPMg 3, y GTP 0.1; solución externa: NaCl 160, CaCl_2 2, glucosa 11, HEPES 5 y CsCl 3. El pH de todas las soluciones fue ajustado a 7.3-7.4 con CsOH (solución de la pipeta) o NaOH (solución externa). Con estas soluciones, la resistencia de acceso de las neuronas se encontró entre 1 a 10 $\text{G}\Omega$. Las corrientes de célula completa fueron registradas en una PC usando el software Axotape (Axon Instruments) y analizadas en una computadora Macintosh con el software Axograph (Axon Instruments). La cámara de registro fue continuamente perfundida con solución externa aproximadamente a una velocidad de 2 ml/min (Figura 6). Cambios rápidos en la solución externa fueron realizados utilizando un dispositivo de ocho-tubos, estos tubos estaban conectados a jeringas que contenían las soluciones control y experimental. El tubo que contenía la solución control fue colocado enfrente de la célula por registrar y una aplicación externa de la solución experimental fue realizada por el cambio

brusco del tubo control por el tubo que liberaba esta misma solución más la sustancia experimental. Las sustancias experimentales fueron removidas por el regreso a la solución control. Las soluciones externa fueron liberadas por gravedad y el nivel de la jeringa fue continuamente ajustado para minimizar los cambios en la velocidad del flujo. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente ($\sim 23^{\circ}\text{C}$) a menos que otra cosa se indique.

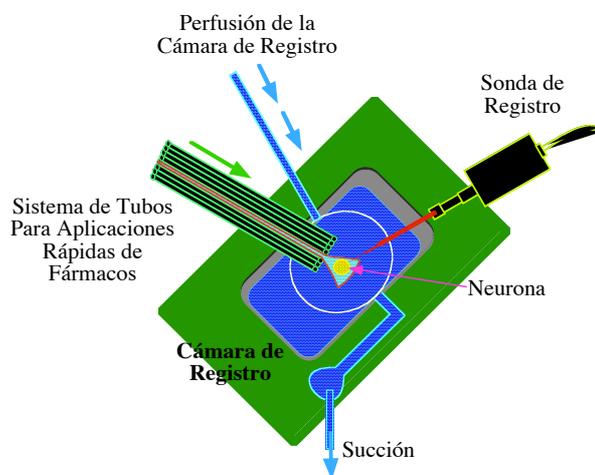


Figura 6. Representación esquemática de la cámara de registro y del sistema de aplicación rápida de las soluciones experimentales. Esquema creado por Barajas-López.

En la figura 7 se muestra el registro de una corriente típica obtenida con la configuración de célula completa. Se puede observar una corriente entrante inmediatamente después de la aplicación de ACh (*onset*), la cual alcanza su máximo (pico) y se inactiva a pesar de la presencia del agonista. La corriente regresa a sus valores iniciales (caída) después de retirar la ACh.

Medio L-15, MEM, Solución de Hanks, Penicilina-Estreptomicina y L-glutamina fueron comprados de GIBCO; las enzimas colagenasa tipo I y la papaína fueron adquiridas de Worthington; la L-cisteína de Sigma y la dispasa fue adquirida de Roche.

El GABA, la 5-HT y la bicuculina fueron adquiridas de Research Biomedical Inc. (Natick, MA, USA). La estaurosporina fue obtenida de Kamiya, (Thousand Oaks, CA, USA). El ondansetron se adquirió de Glaxo Smithkline (Parma, Italia). CsCl, EGTA, HEPES, NaCl, ATPMg, GTP, NaCl, CaCl₂, glucosa, CsOH, NaOH NaH₂PO₄, MgCl₂, KCl, NaHCO₃ fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO., USA).

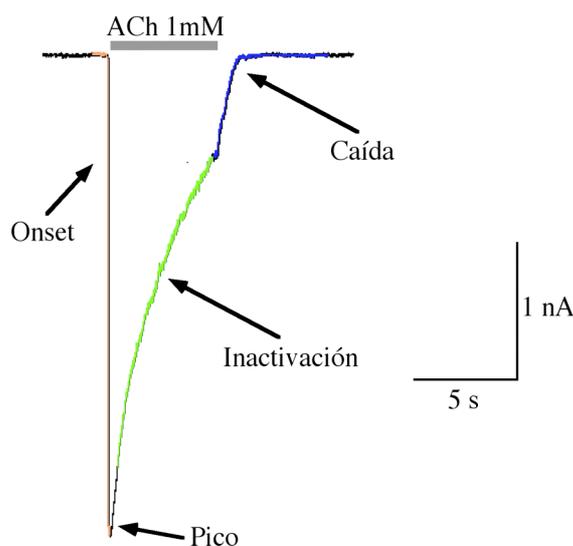


Figura 7. Registro típico de una corriente entrante inducida por ACh. La aplicación de ACh es indicada por la barra. El registro fue realizado utilizando la configuración de célula completa en una neurona mientérica de intestino de cobayo a un potencial de membrana de -60mV.

El ajuste exponencial para el análisis del *onset*, de la caída de la corriente, así como para la inactivación de la corriente se realizó utilizando en software Axograph 4.9 (Axon Instrumens). La técnica que utiliza dicho software es la técnica de Chebyshev, la cual es rápida, no iterativa y estable; fue desarrollada por George C. Malachowski y la licencia es de Axon Instrumens.

La ecuación para el ajuste a la suma de una función exponencial es la siguiente:

$$f_1(t_i) = a_0 + a_1 e^{-t_i/\tau_1}$$

Para la suma de dos funciones exponenciales:

$$f_2(t_i) = a_0 + a_1 e^{-t_i/\tau_1} + a_2 e^{-t_i/\tau_2}$$

Para la suma de tres funciones exponenciales:

$$f_2(t_i) = a_0 + a_1e^{-t_i/\tau_1} + a_2e^{-t_i/\tau_2} + a_3e^{-t_i/\tau_3}$$

Los resultados fueron expresados en promedio \pm S.E.M. y el número de células usado como n . Utilizamos la prueba t -Student pareada para evaluar las diferencia entre los valores promedio obtenidos de un mismo grupo de células y la prueba t -Student no pareada cuando los datos fueron obtenidos de un grupo distinto de células. Los valores de P a dos-colas de 0.05 o menos fueron considerados como estadísticamente diferentes. También se utilizó la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett cuando se hicieron comparaciones múltiples de promedios.

VII. Resultados

a. Propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de las corrientes de célula completa inducidas por ácido γ -aminobutírico, acetilcolina y serotonina

Las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de la conductancia de membrana y las corrientes de célula completa activadas por GABA (I_{GABA}), ACh (I_{ACh}) y 5-HT ($5-HT_3$) en neuronas entéricas han sido previamente reportadas (Cherubini and North 1984, 1985; Derkach y *col.* 1989; Zhou and Galligan 2000). Estas corrientes de células completa son mediadas por la activación de receptores permeables a cloruro ($GABA_A$) y a cationes ($nACh$, $5-HT_3$), respectivamente.

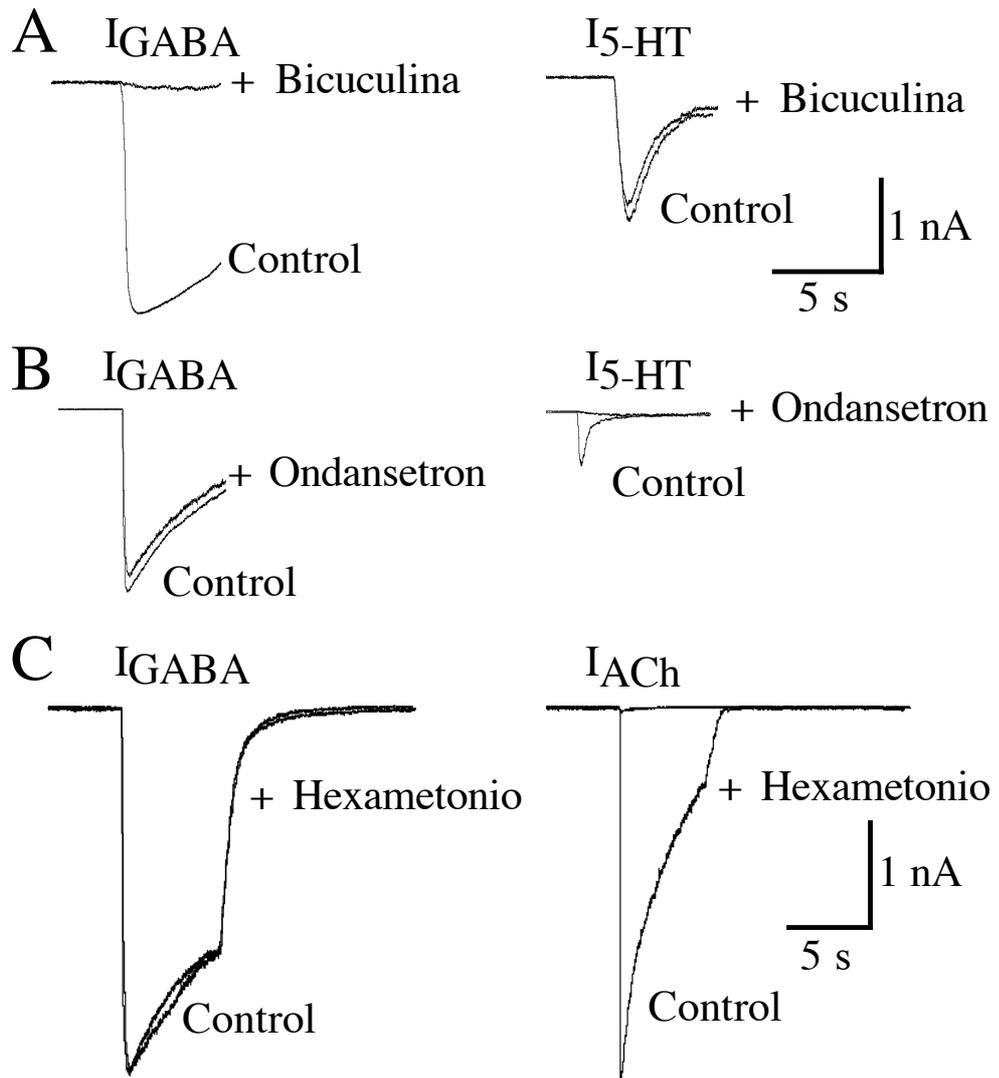
Usando una solución interna con bajo cloruro, con aplicaciones individuales de GABA, ACh y 5-HT indujeron corrientes entrantes a un potencial de membrana de -60 mV. Las curvas concentración-respuesta fueron obtenidas para estos transmisores y analizadas (Barajas-Lopez y *col.* 2002). El valor de EC_{50} fue de 55 μ M para 5-HT con un coeficiente de Hill de 1.0 ± 0.1 (no significativamente diferente de la unidad). La amplitud de corriente inducida por 5-HT (1 mM) fue variable en las células desde unos cuantos pA hasta -7 nA pero en la mayoría de los casos, su valor fue entre -1 y -3 nA. Para el caso de la 5-HT se incluyeron amplitudes de corriente por arriba de -200 pA. Los valores de EC_{50} para GABA y ACh fueron 104 y 324 μ M, mientras que los valores del coeficiente de Hill fueron 1.3 ± 0.1 y 1.6 ± 0.18 , respectivamente. La amplitud de corriente inducida por concentraciones máximas de GABA (0.3 mM) y ACh (1 mM) tuvo un valor promedio de 0.18-

7.4 nA (rango desde unos pocos pA hasta -7.4 nA). Sin embargo, las corrientes incluidas en el análisis tuvieron al menos -100 pA de amplitud. En estas células, el promedio de la amplitud del pico de I_{GABA} y I_{ACh} -2.46 ± 0.54 (n=232 de 333) y -0.79 ± 0.11 nA (n=235 de 333), mientras que, el promedio del pico de la amplitud de I_{5-HT} fue de -1.48 ± 0.09 (n=124 de 136). Se observó una mayor variabilidad en la amplitud de I_{GABA} que en la de I_{ACh} . La amplitud de estas corrientes fue independiente una de la otra, de hecho, algunas células sólo generaron I_{GABA} (62 de 333), I_{ACh} (65 de 333 neuronas), o I_{5-HT} (33 de 139 neuronas), indicando que estos receptores son expresados independientemente en neuronas mientéricas.

Como se muestra en la figura 8A-8B, las corrientes entrantes inducidas por GABA (0.3 mM) y 5-HT (1 mM) fueron totalmente inhibidas por bicuculina (30 μ M; n=6) y ondansetron (0.3 μ M; n=5), respectivamente. El ondansetron fue específico en I_{5-HT} y no afectó I_{GABA} , sin embargo, la bicuculina (30 μ M) bloqueo parcialmente 25% de I_{5-HT} . Este último efecto de la bicuculina sobre I_{5-HT} ha sido previamente reportado (Takenouchi and Munekata 1998; Sun and Machu 2000).

Los *onsets* de I_{ACh} y I_{GABA} fueron aparentemente los mismos. De esta manera el tiempo requerido para alcanzar la corriente media máxima no fue significativamente diferente en seis células analizadas. Este tiempo tuvo valores promedios de 28.68 ± 9.68 y 34.02 ± 16.18 ms para I_{GABA} y I_{ACh} , respectivamente. Estas corrientes alcanzaron sus picos dentro de los siguientes segundos. Después de alcanzar sus amplitudes máximas las corrientes disminuyeron a pesar de la presencia de los transmisores

Figura 8. Las corrientes inducidas por GABA (I_{GABA}), ACh (I_{ACh}) y 5-HT (I_{5-HT}) son mediadas por receptores $GABA_A$, nACh y $5-HT_3$, respectivamente. A: La bicuculina (30 μ M; un antagonista de los receptores $GABA_A$) inhibe I_{GABA} . **B:** El ondansetron (30 μ M; un bloqueador de los receptores $5-HT_3$) inhibe I_{5-HT} sin afectar I_{GABA} . **C:** El hexametonio (1 mM; antagonista de los receptores nACh) bloquea la I_{ACh} sin afectar la I_{GABA} . Las corrientes mostradas en **A**, **B** y **C** fueron registradas de tres diferentes neuronas mientéricas, a un potencial de membrana de -60 mV, en respuesta a GABA (0.3 mM), ACh (1 mM) y 5-HT (1 mM). Las corrientes control fueron registradas antes y cinco minutos después de la aplicación de bicuculina, ondansetron o hexametonio. La bicuculina abatió totalmente la I_{GABA} pero su efecto no fue específico porque también inhibió un 25% de I_{5-HT} y su efecto sobre I_{ACh} fue aún mayor inhibiendo aproximadamente un 85% de la corriente. El ondansetron y el hexametonio, sin embargo, tuvieron un efecto específico inhibiendo I_{5-HT} y I_{ACh} , respectivamente. Por lo tanto, estos resultados indican que el efecto de los agonistas es específico en uno u otro receptor $GABA_A$, $5-HT_3$ o nACh, a pesar de las concentraciones relativamente altas.



(inactivación de corriente), indicando taquifilaxia del receptor. La inactivación de los receptores GABA_A fue menor que la observada en los receptores nACh. En seis células analizadas tratadas con aplicaciones largas (90 s) de GABA, la inactivación del receptor fue mejor ajustada a la suma de dos funciones exponenciales (los valores para τ de estas funciones se dan abajo). En las mismas seis células tratadas con aplicaciones largas (90 s) de ACh, la inactivación fue mejor ajustada a la suma de dos funciones exponenciales (los valores para τ de estas funciones se dan abajo). El valor de τ_1 de I_{GABA} fue significativamente diferente ($P < 0.05$) que el valor de τ_1 de I_{ACh} . Mientras tanto, el valor de τ_2 de I_{GABA} y el valor de τ_2 de I_{ACh} no fueron diferentes. Después de remover los agonistas de la solución externa, las corrientes disminuyeron hasta desaparecer. Esta caída fue bien ajustada a una sola función exponencial con valores promedio de τ de 0.83 ± 0.09 y 0.48 ± 0.06 s para I_{GABA} y I_{ACh} , respectivamente ($n=7$). Estos valores fueron significativamente diferentes ($P < 0.005$).

En cuanto al análisis de las interacciones entre GABA y 5-HT se determinó que el *onset* de I_{GABA} y de I_{5-HT} también fue el mismo. Así, el tiempo requerido para alcanzar la corriente media máxima no fue significativamente diferente en seis células analizadas. Este tiempo tuvo un valor promedio de 191 ± 33 y 174 ± 35 ms para I_{GABA} y I_{5-HT} , respectivamente. Al igual que GABA y ACh, esta combinación de receptores también presentaron taquifilaxia. La desensibilización de los receptores GABA_A fue claramente más lenta que la observada para los receptores 5-HT₃. En siete neuronas analizadas expuestas a aplicaciones largas (90 s) de GABA, la desensibilización del

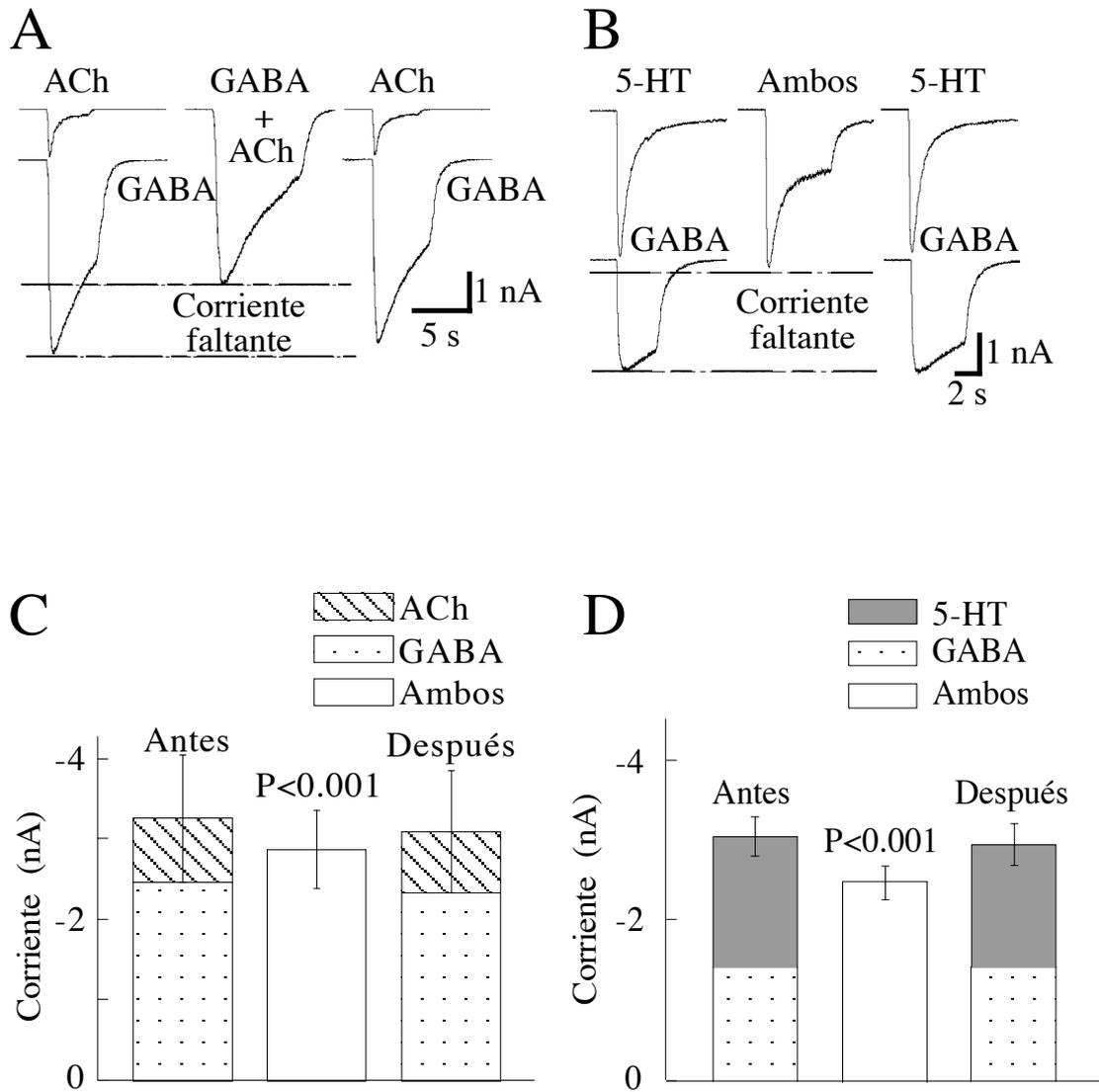
receptor fue mejor ajustada a la suma de dos funciones exponenciales. Mientras que en las mismas neuronas, la desensibilización de los receptores 5-HT₃ se ajustó mejor a la suma de tres funciones exponenciales. Los valores de τ_1 y τ_2 de I_{GABA} fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$); de los valores de τ_1 y τ_2 de I_{5-HT} . Finalmente, las corrientes disminuyeron hasta que desaparecieron una vez que el agonista fue removido de la solución externa. Esta caída fue más rápida para I_{GABA} que para I_{5-HT} . La caída de ambas corrientes, sin embargo, fue mejor ajustada a una sola función exponencial con valores promedio de τ significativamente diferentes ($P < 0.001$); 0.8 ± 0.1 y 10.4 ± 1.6 s para I_{GABA} y I_{5-HT} , respectivamente ($n=10$).

b. Las corrientes inducidas por GABA, ACh y 5-HT no son aditivas

Los experimentos descritos arriba demostraron que I_{GABA} , I_{ACh} y I_{5-HT} tienen diferentes cinéticas y que estaban mediadas por la activación farmacológica de los diferentes receptores. Si dos corrientes son mediadas por receptores iónicos independientes entonces las corrientes inducidas por concentraciones de GABA 0.3 mM, 5-HT 1 mM y de ACh 1 mM (cuando la ocupación del receptor es entre un 70 y 100%) deberían ser aditivas. Para investigar si esto sucede, medimos el pico de I_{ACh} , I_{GABA} y I_{5-HT} y la corriente inducida por la aplicación simultánea de los dos agonistas a las mismas concentraciones ($I_{GABA+ACh}$ o en su caso $I_{GABA+5-HT}$) en la misma neurona.

Primero analizamos qué sucedió en el caso de los receptores GABA_A y nACh. Se encontró que la suma de las corrientes individuales ($I_{ACh} + I_{GABA} = I_{Esperada}$; -3.18 ± 0.51 nA), fue significativamente mayor ($P < 0.001$; $n=26$) que $I_{GABA+ACh}$; (-2.88 ± 0.48 nA), revelando así una oclusión entre I_{GABA} y I_{ACh}

Figura 9. Las corrientes inducidas por GABA (I_{GABA}), ACh (I_{ACh}) y 5-HT ($I_{\text{5-HT}}$), no son aditivas, revelando una oclusión de corriente. En **A** y **B**, se muestran los registros de dos experimentos típicos: **A**, corrientes inducidas por GABA y ACh y **B**, corrientes inducidas por GABA y 5-HT. Nótese que la aplicación simultánea de GABA+ACh o de GABA+5-HT induce siempre una corriente menor que la suma de las corrientes individuales. **C**: valores promedio (barras) de veintiséis experimentos. Las corrientes fueron inducidas por la aplicación de GABA (0.3 mM) o ACh (1 mM), y por la aplicación simultánea de estos dos agonistas ($I_{\text{GABA+ACh}}$). I_{GABA} y I_{ACh} fueron registradas cinco minutos antes y cinco minutos después de $I_{\text{GABA+ACh}}$. La primera y la tercera barra muestran el valor promedio de la suma de las corrientes individuales (I_{GABA} y I_{ACh}) que representan la corriente esperada ($I_{\text{Esperada}} = I_{\text{GABA}} + I_{\text{ACh}}$). Los S.E.M. son las líneas arriba de las barras para I_{Esperada} y $I_{\text{GABA+ACh}}$. Esta última es significativamente menor que I_{Esperada} . **D**: valores promedio de 33 experimentos. Las corrientes fueron inducidas por la aplicación de GABA (0.3 mM) o 5-HT (1 mM) y por la aplicación simultánea de estos agonistas ($I_{\text{GABA+5-HT}}$). I_{GABA} y $I_{\text{5-HT}}$ fueron registradas cinco minutos antes y cinco minutos después de $I_{\text{GABA+5-HT}}$. La primera y la tercera barra muestran el valor promedio de la corriente esperada. Obsérvese que la $I_{\text{GABA+5-HT}}$ es significativamente menor que I_{Esperada} .



(Fig. 9A y 9C). Con el fin de descartar la posibilidad de que la oclusión de corriente fuera debida a la resistencia de acceso de la célula completa, 85 a 95% de esta fue compensada ($4.56 \pm 0.83 \text{ M}\Omega$) en 10 de las 26 células previamente descritas. En estos experimentos, I_{Esperada} ($-4.06 \pm 1.04 \text{ nA}$) fue aún significativamente mayor que $I_{\text{GABA+ACh}}$ ($-3.83 \pm 1.03 \text{ nA}$; $P < 0.01$).

Por otro lado, nuestras observaciones indican que la activación de los receptores GABA_A y 5-HT_3 no es independiente; encontramos que la suma matemática de las corrientes individuales ($I_{5\text{-HT}} + I_{\text{GABA}} = I_{\text{Esperada}}$; $-3.05 \pm 0.25 \text{ nA}$) produjo una corriente significativamente ($P < 0.001$; $n=33$) mayor que $I_{\text{GABA+5-HT}}$ ($-2.51 \pm 0.24 \text{ nA}$). La cual también reveló una oclusión entre $I_{5\text{-HT}}$ y I_{GABA} (Fig. 9B, 9D). Nuevamente, para descartar la posibilidad de que la oclusión de corriente fuera debida a la resistencia de acceso de la célula completa, 60 a 95% ($7.88 \pm 0.46 \text{ M}\Omega$) de esta corriente fue compensada en nueve de las treinta y tres neuronas previamente descritas. En estos experimentos, I_{Esperada} ($-4.21 \pm 0.64 \text{ nA}$) fue significativamente mayor que $I_{\text{GABA+5-HT}}$ ($-3.27 \pm 0.48 \text{ nA}$; $P < 0.01$).

c. Cinética de las corrientes inducidas por la aplicación simultánea de los dos agonistas

En la figura 10A se muestra el promedio del *onset* de I_{GABA} , I_{ACh} , $I_{\text{GABA+ACh}}$, y I_{Esperada} de seis neuronas analizadas y se demuestra la presencia de una corriente de oclusión desde el inicio de su activación. La oclusión fue significativa a los 15 ms ($P < 0.05$) después del inicio de la corriente. A este tiempo, el promedio de I_{Esperada} fue $-62.7 \pm 16.03 \text{ pA}$ y para $I_{\text{GABA+ACh}}$ $-16 \pm 4.4 \text{ pA}$. En otras palabras, la oclusión de corriente ocurre tan pronto como se

presenta la activación de los receptores, encontramos resultados similares al analizar las corrientes de GABA y 5-HT (Fig. 10B). Aquí, mostramos que esta oclusión fue significativamente diferente ($P < 0.01$; $n = 9$) después del inicio de estas corrientes. A este tiempo (15 ms), el promedio de I_{Esperada} fue de -100 ± 16 pA y $I_{\text{GABA+5-HT}} -60 \pm 15$ pA.

La figura 11A muestra el promedio de I_{GABA} , I_{ACh} , $I_{\text{GABA+ACh}}$ de seis neuronas expuestas a una larga aplicación (90 s) de los neurotransmisores. Un análisis visual de estos registros revela que $I_{\text{GABA+ACh}}$ desensibiliza más rápidamente que I_{GABA} pero más lentamente que I_{ACh} . Para cuantificar esto, se realizó un ajuste exponencial usando los datos de la fase de desensibilización (inactivación). La inactivación de $I_{\text{GABA+ACh}}$ fue mejor ajustada a la suma de dos funciones exponenciales, así como I_{GABA} y I_{ACh} . Los valores de τ para la primera exponencial (τ_1) de $I_{\text{GABA+ACh}}$ y la τ_1 de I_{ACh} fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) (Fig. 11B). Mientras que en la figura 11C se muestra el promedio de I_{GABA} , $I_{\text{5-HT}}$, $I_{\text{GABA+5-HT}}$ y I_{Esperada} de siete neuronas expuestas a una larga aplicación (90 s) del neurotransmisor. Encontramos que $I_{\text{GABA+5-HT}}$ desensibiliza más rápido que I_{GABA} pero más lento que $I_{\text{5-HT}}$. Al hacer el ajuste exponencial observamos que, la inactivación de $I_{\text{GABA+5-HT}}$ fue mejor ajustada a la suma de tres funciones exponenciales, como $I_{\text{5-HT}}$ los valores de τ de la tercera exponencial (τ_3) fueron mayores que el periodo de registros analizados y fueron rechazados para posteriores análisis. Los valores de τ para la primera (τ_1) y segunda (τ_2) exponencial para $I_{\text{GABA+5-HT}}$ fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) que el valor correspondiente de τ de I_{GABA} o de $I_{\text{5-HT}}$ (Fig. 11D).

Figura 10. La oclusión de las corrientes ocurre tan rápidamente como la activación de los receptores. A: *onset* de las corrientes inducidas por GABA (I_{GABA}), ACh (I_{ACh}), GABA+ACh ($I_{\text{GABA+ACh}}$), y la I_{Esperada} ($I_{\text{GABA}}+I_{\text{ACh}}$). Todos los registros mostrados son promedios de corrientes de un total de seis neuronas mientéricas. **B:** *onset* de las corrientes inducidas por GABA (I_{GABA}), 5-HT ($I_{\text{5-HT}}$), GABA+5-HT ($I_{\text{GABA+5-HT}}$), y la I_{Esperada} ($I_{\text{GABA}}+I_{\text{A5-HT}}$). Todos los registros mostrados son promedios de corrientes de un total de nueve neuronas mientéricas. Nótese que la corriente inducida por ambos agonistas es significativa ($P<0.05$) menor que la I_{Esperada} , tanto en **A** como en **B**. tan pronto como las corrientes son detectadas. Solamente la porción inicial de las corrientes (~ 1 s) es mostrada y estas fueron registradas a un potencial de membrana de -60 mV.

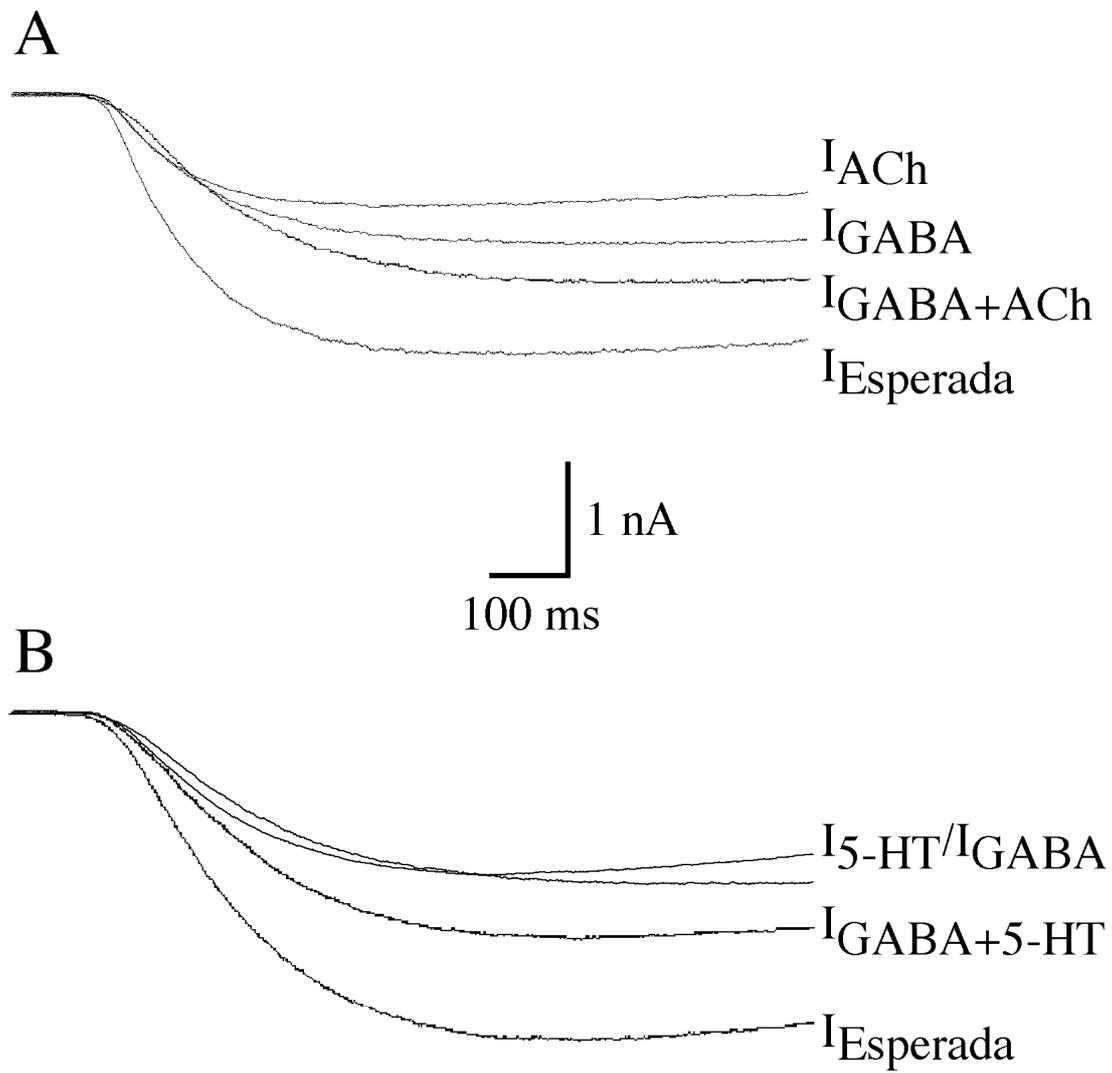
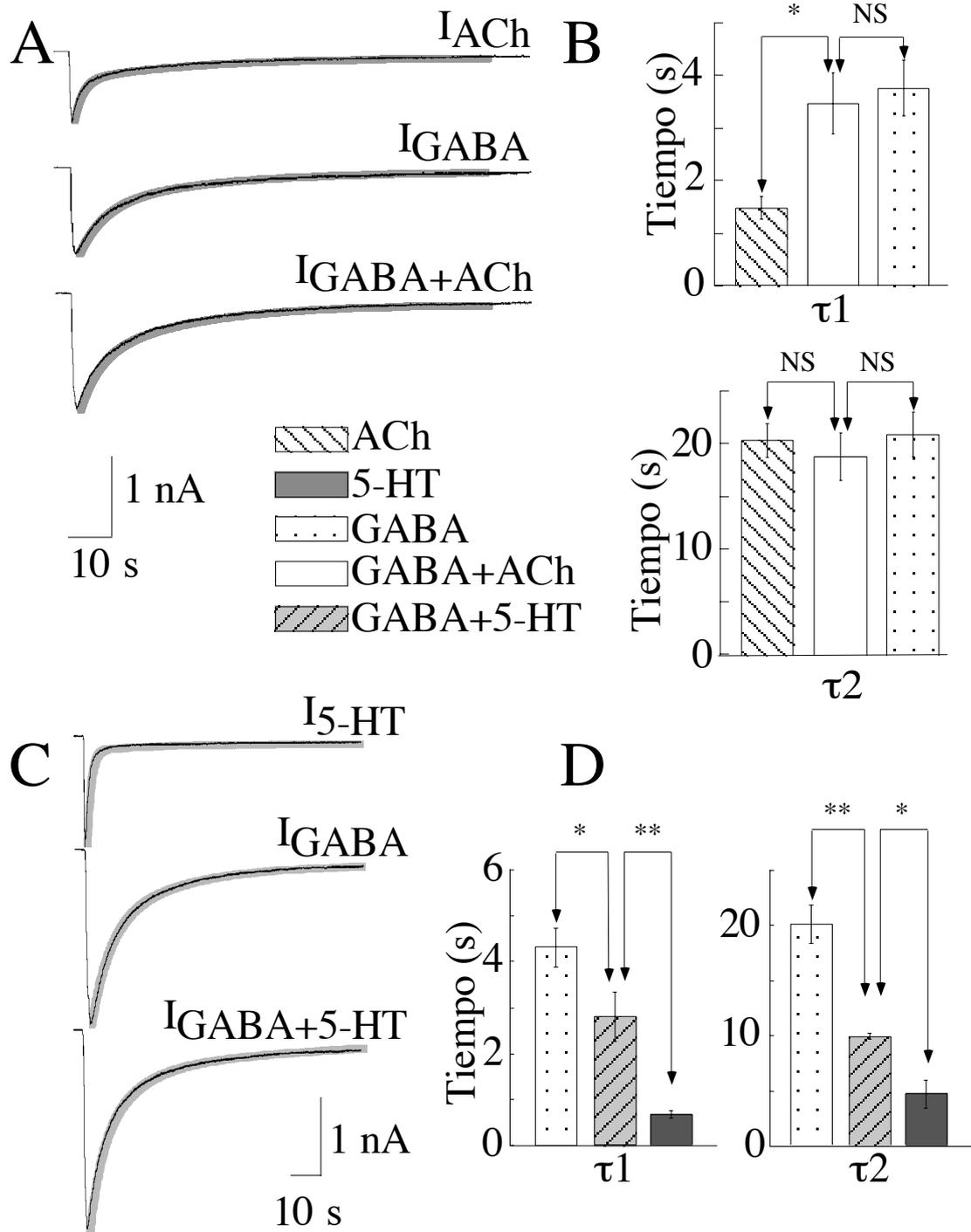


Figura 11. La cinética de inactivación de las corrientes inducidas por ambos agonistas es diferente de la cinética de las corrientes individuales. **A:** registros representativos de I_{GABA} , I_{ACh} y $I_{GABA+ACh}$ de la misma neurona mientérica. La desensibilización de las tres corrientes se ajustó mejor a la suma de dos funciones exponenciales (líneas grises sobrepuestas a cada registro). **B:** Las barras y la línea en la parte superior de estas representan el promedio y el S.E.M. de los valores τ de las dos funciones exponenciales. El valor de τ_1 de la exponencial de I_{ACh} fue significativamente menor que el valor correspondiente de τ de $I_{GABA+ACh}$. Los valores τ de las dos exponenciales de I_{GABA} no fueron diferentes (NS, no significativo) de los valores τ de las exponenciales correspondientes de $I_{GABA+ACh}$. El ajuste a las funciones exponenciales fue realizado usando los datos entre el pico y el estado *cuasi* estacionario de las corrientes. **C:** Registros promedio de I_{GABA} , I_{5-HT} y $I_{GABA+5-HT}$ provenientes de siete neuronas. La desensibilización de I_{5-HT} y $I_{GABA+5-HT}$ se ajustó mejor a la suma de tres funciones exponenciales (líneas grises), mientras que I_{GABA} fue mejor ajustada a la suma de dos funciones exponenciales. El valor de τ de la tercera exponencial (τ_3) fue mayor que el periodo de registro analizado y no fue analizado. Nótese que $I_{GABA+5-HT}$ se inactiva más rápido que I_{GABA} pero más lento que I_{5-HT} . **D:** Las barras y la línea en la parte superior de estas representan el promedio y el S.E.M. de los valores τ de las dos primeras funciones exponenciales. Los promedios de τ_1 y τ_2 de I_{GABA} fueron mayores que τ_1 y τ_2 de $I_{GABA+5-HT}$, respectivamente. Los promedios de τ_1 y τ_2 de I_{5-HT} fueron menores que los de τ_1 y τ_2 de $I_{GABA+5-HT}$, respectivamente. Los agonistas fueron aplicados por aproximadamente 90 segundos y el potencial de membrana fue de -60mV. Las comparaciones estadísticas en **B** y **D** fueron realizadas con las pruebas de ANOVA y Dunnett. *= $P < 0.05$; **= $P < 0.01$.



Después de retirar los agonistas de la solución externa (lavado), la caída de $I_{GABA+ACh}$ parece ser diferente de I_{ACh} (Fig. 12A y 12B). La caída de $I_{GABA+ACh}$ fue bien ajustada a una función exponencial ($n=7$). El promedio del valor de τ de esta exponencial fue virtualmente el mismo para la τ de la caída de I_{GABA} pero diferente del τ de la caída de I_{ACh} (Fig. 12B). Por lo que estas observaciones indican que $I_{GABA+ACh}$ esta mediado por la apertura de ambos receptores nACh y $GABA_A$.

En cuanto a la caída de $I_{GABA+5-HT}$ parece ser diferente de I_{GABA} o de la I_{5-HT} (Fig. 12C y 12D). Es más, la caída de $I_{GABA+5-HT}$ fue mejor ajustada a la suma de dos funciones exponenciales ($n=10$). Probamos la hipótesis de que estas dos funciones exponenciales de $I_{GABA+5-HT}$ son las funciones exponenciales de la caída de I_{GABA} y de I_{5-HT} . Entonces el valor promedio de τ de la primera exponencial (τ_1) fue la misma para τ_1 de la caída de I_{GABA} y el valor promedio de τ de la segunda exponencial (τ_2) de $I_{GABA+5-HT}$ no es diferente de τ_1 de la caída de $I_{GABA+5-HT}$ (Fig. 12D). Estas observaciones son consistentes con la hipótesis de que $I_{GABA+5-HT}$ es mediada por la activación de ambos receptores $GABA_A$ y $5-HT_3$. Para investigar más allá de esta hipótesis probamos ambos receptores $GABA_A$ y nACh, así como, $GABA_A$ y $5-HT_3$ son desensibilizados por la aplicación simultánea de los dos agonistas.

d. La aplicación simultánea de los agonistas desensibiliza los receptores $GABA_A$ y los $5-HT_3$; los $GABA_A$ y los nACh

Encontramos que la aplicación de $GABA+5-HT$, disminuyó ambas I_{GABA} y I_{5-HT} en menos del 20% de su amplitud control (Fig. 8). Esto no resulta de una

desensibilización cruzada, ya que la desensibilización del receptor 5-HT₃ no afecta I_{GABA} y similarmente, $I_{5\text{-HT}}$ no fue afectada por la desensibilización del receptor GABA_A solo (Fig. 13Ac, Ad). Estas y las observaciones de la cinética (Fig. 10-12) indican que $I_{\text{GABA}+5\text{-HT}}$ es llevada a través de ambos receptores canal y que esta oclusión de corriente es mediada por la inhibición parcial de ambos receptores.

En los siguientes experimentos, medimos la amplitud de I_{GABA} y de I_{ACh} antes (5 min) e inmediatamente después (~5 s) de una aplicación larga de ACh+GABA. La aplicación del agonista se mantuvo hasta que el pico de la corriente disminuyó en un 80% de su amplitud inicial (aproximadamente a los 90 s). Algunos registros típicos y el promedio de los datos son mostrados en la figura 13Ba-d. Observamos que la aplicación de ACh+GABA disminuyó ambas I_{ACh} (Fig. 13Ba) y I_{GABA} (Fig. 13Bb) en menos del 20% de su amplitud control (Fig. 13Be). Tal inhibición no fue debida a una desensibilización cruzada porque el receptor nACh no afecta la I_{GABA} (Fig. 13Bc) y el receptor GABA_A no afecta la I_{ACh} (Fig. 13Ad). Estas observaciones, junto con el hecho de que la cinética de $I_{\text{GABA}+\text{ACh}}$ es diferente de la cinética individual de I_{GABA} o de I_{ACh} (Fig. 10-12) indican que $I_{\text{GABA}+\text{ACh}}$ es llevada a través de ambos receptores GABA_A y nACh. Esto, al igual que para GABA y 5-HT, también indican que la oclusión de corriente es mediada parcialmente por ambos receptores.

Figura 12. Análisis de la cinética de la caída de las corrientes inducidas por GABA (I_{GABA}), ACh (I_{ACh}) y 5-HT (I_{5-HT}). **A:** Corrientes representativas inducidas por GABA (I_{GABA}), ACh (I_{ACh}) y ambos agonistas ($I_{GABA+ACh}$), registradas de la misma neurona mientérica. La caída de I_{GABA} , I_{ACh} y $I_{GABA+ACh}$ fue mejor ajustada por una sola función exponencial (línea gris sobrepuesta a los registros originales). **B:** las barras y la línea sobre la parte superior de estas representan el promedio y el S.E.M. de los valores τ de las exponenciales de siete neuronas. El τ_1 de I_{GABA} no fue significativamente diferente (**NS**) del τ_1 de $I_{GABA+ACh}$. El τ_1 de I_{ACh} fue significativamente diferente del τ_1 de $I_{GABA+ACh}$. **C:** Corrientes representativas inducidas por GABA (I_{GABA}), 5-HT (I_{5-HT}) y ambos agonistas ($I_{GABA+I_{5-HT}}$) de la misma neurona mientérica. La caída de $I_{GABA+I_{5-HT}}$ fue mejor ajustada a la suma de dos funciones exponenciales, mientras que para I_{GABA} y I_{5-HT} fue mejor ajustada a una sola función exponencial. **D:** las barras y la línea en la parte superior de estas representan el promedio y el S.E.M. del τ de diez neuronas mientéricas. La τ_1 de I_{GABA} no fue significativamente diferente (**NS**) del τ_1 de $I_{GABA+I_{5-HT}}$. τ_1 de I_{5-HT} no fue diferente de τ_2 de $I_{GABA+I_{5-HT}}$. El ajuste exponencial fue realizado usando los datos de un par de cientos de milisegundos después de remover los agonistas hasta el componente del estado estacionario. En estos experimentos el potencial de membrana fue -60 mV.

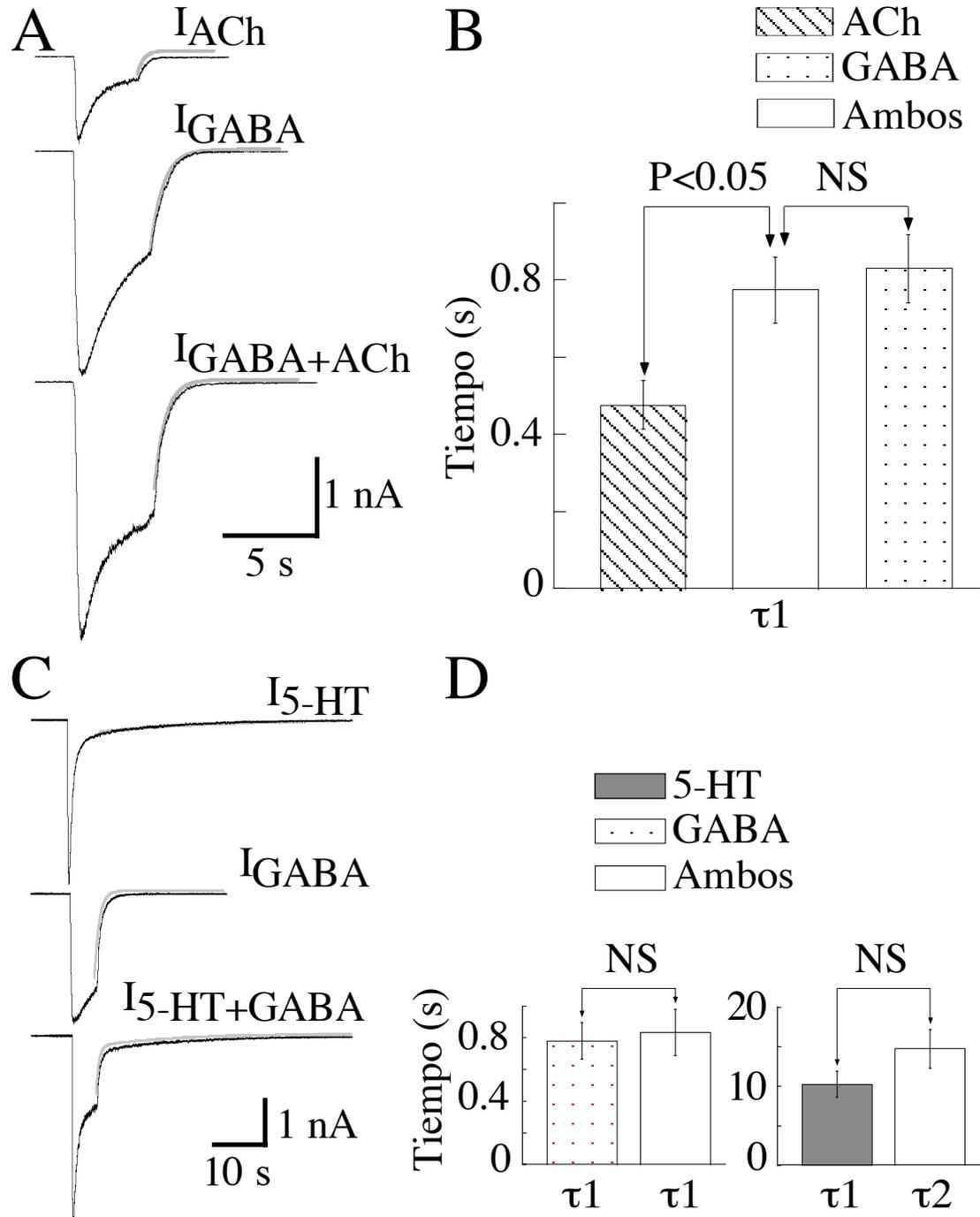
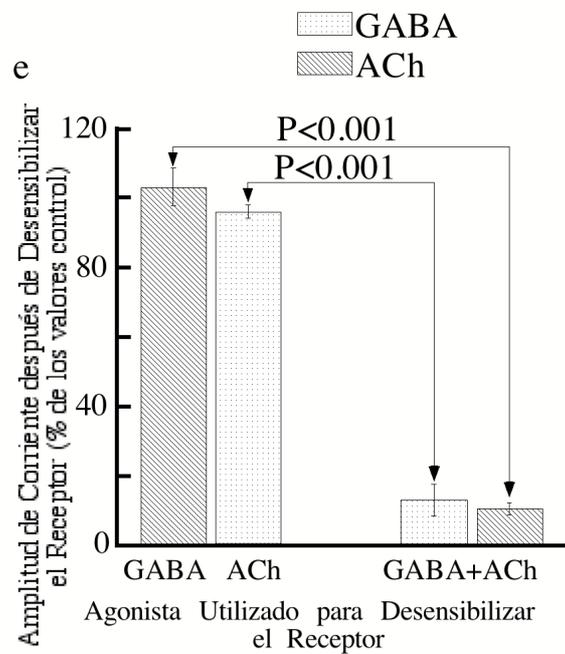
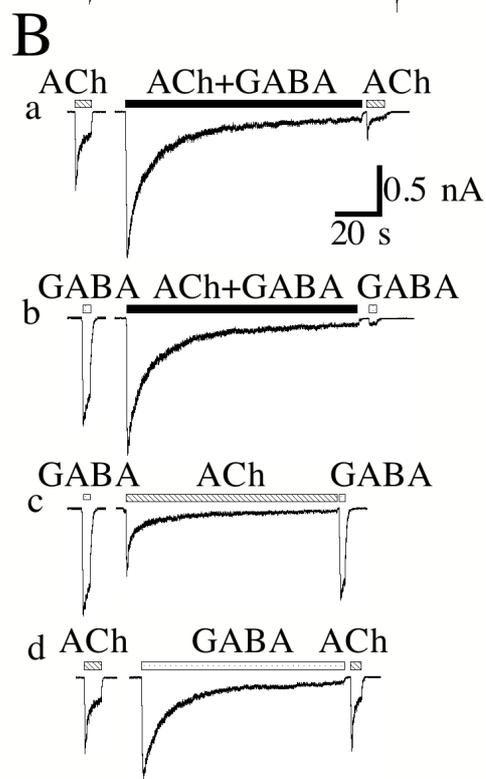
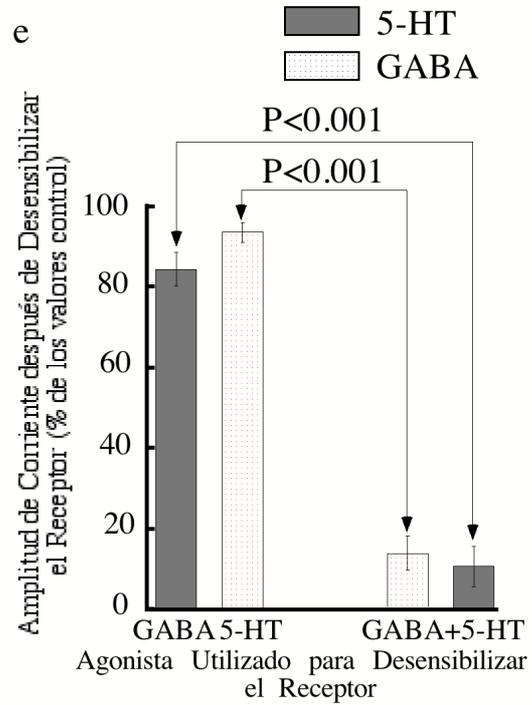
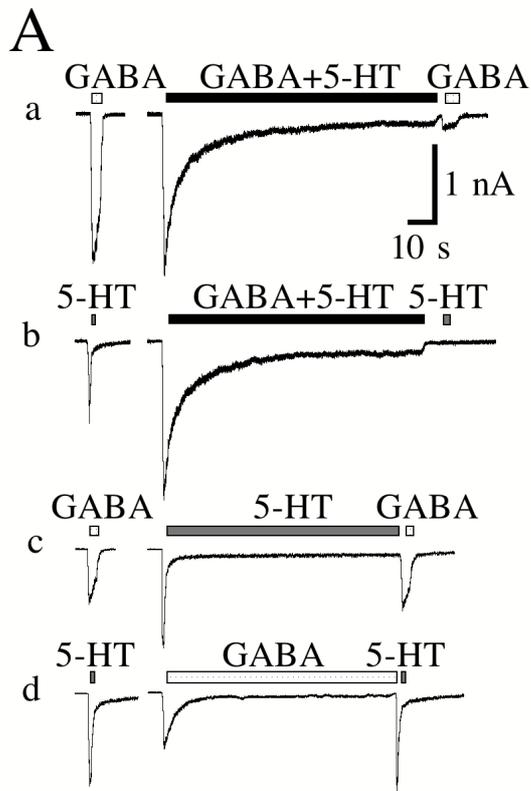


Figura 13. La aplicación simultánea de dos agonistas induce corrientes mediadas por los dos receptores ionotrópicos esperados. A: La aplicación de GABA+5-HT desensibiliza los receptores 5-HT₃ y los GABA_A, lo cual no se debe a la desensibilización cruzada entre estos receptores. **B:** Igualmente, la aplicación de GABA+ACh desensibiliza los receptores nACh y los GABA_A, lo cual tampoco se debe a una desensibilización cruzada entre estos receptores. En cada uno de los paneles se muestra un registro control de una corriente individual inducida 5 min antes de los registros de la derecha. En los paneles **a** y **b** se observa que la aplicación simultánea de ambos agonistas desensibiliza los receptores involucrados. En los paneles **c** y **d** se muestra que la desensibilización de un solo receptor no afecta al otro. En los paneles **e** se muestran los promedios (barras) y el S.E.M. (líneas) del porcentaje de inhibición de las corrientes individuales después de la estimulación con diferentes agonistas. Cada maniobra experimental se repitió en 7 a 13 neuronas.



e. Mecanismos pre-receptor y artefactos técnicos como el origen de la oclusión de corriente

En los siguientes experimentos se descartó que la oclusión de corriente fuera debida a un mecanismo pre-receptor. En siete células analizadas con muy baja respuesta o sin respuesta inicial a ACh (-25.4 ± 16.5 pA; Fig. 14Aa), $I_{\text{GABA+ACh}}$ (-2444.7 ± 325.7 pA) tuvo la misma amplitud y cinética similar que I_{GABA} solo (2709.1 ± 558.4 pA). Similarmente, en otras seis células, en las cuales I_{GABA} no tuvo respuesta inicial a GABA (0.0 pA; Fig 14Ac), $I_{\text{GABA+ACh}}$ (-2554.8 ± 648.2 pA) tuvo la misma amplitud y cinética similar que I_{ACh} sola (-2586.7 ± 605.5 pA). Adicionalmente, en otras siete células, en las cuales I_{ACh} (-21.29 ± 13.8 pA) fue previamente bloqueada con hexametonio 1 mM (Fig. 14Ab), $I_{\text{GABA+ACh}}$ (-1318.7 ± 458.3 pA) tuvo la misma amplitud que I_{GABA} (1299.3 ± 450.4 pA). Sin embargo, nosotros no encontramos antagonistas específicos para el GABA, ya que la picrotoxina (1mM; n=5) y la bicuculina (30 μ M; n=3) afectaron la corriente inducida por la ACh entre 61 y 84%, respectivamente (Demuro y *col.* 2001; Erkkila y *col.* 2004).

Por otro lado, se ha mostrado que las moléculas de 5-HT pueden inhibir directamente los receptores nACh en neuronas entéricas (Barajas-Lopez y *col.* 2001). Aquí investigamos la posibilidad de que la oclusión de corriente es mediada por los efectos inhibidores de la 5-HT o del GABA sobre los receptores GABA_A y 5-HT_3 , respectivamente. En ocho células sin respuesta o respuesta marginal a GABA, $I_{\text{GABA+5-HT}}$ tuvo amplitud similar (-1.20 ± 0.38 nA) y cinética a $I_{5\text{-HT}}$ (-1.10 ± 0.16 nA; Fig. 14Ba). En otras seis

células en las cuales I_{GABA} fue completamente bloqueada con bicuculina (30 μM), $I_{\text{GABA}+5\text{-HT}}$ tuvo amplitud similar (-1.72 ± 0.25 nA) y cinética a $I_{5\text{-HT}}$ (-1.72 ± 0.24 nA; Fig. 14Bb). En siete células sin respuesta o respuesta marginal a 5-HT, $I_{\text{GABA}+5\text{-HT}}$ tuvo una amplitud similar (-2.54 ± 0.73 nA) y cinética a I_{GABA} (-2.21 ± 0.67 nA; Fig. 14Bc). Observaciones similares fueron obtenidas cuando $I_{5\text{-HT}}$ fue inhibida por ondansetron 3 μM (Fig. 14Bd).

Varias observaciones descartaron la posibilidad de que la oclusión de corriente fuera debida a un artefacto técnico de nuestro sistema de registro. Sin embargo, nuestro amplificador es capaz de registrar corrientes iónicas grandes y rápidas en las mismas neuronas y bajo exactamente las mismas condiciones de registro. De esta forma, fuimos capaces de registrar corrientes entrantes de Ca^{2+} y Na^+ activadas por voltaje tan grandes como -9000 pA y que, en varios casos, fueron mayores que la I_{Esperada} a -60mV (pA). Es también importante señalar que el *onset* de las corrientes de Ca^{2+} y Na^+ activadas por voltaje es más rápida (unos pocos milisegundos) que la de I_{GABA} , I_{ACh} y $I_{5\text{-HT}}$ (cientos de milisegundos).

f. Papel de la fosforilación de proteínas y el Ca^{2+} intracelular en la oclusión de corriente

Es conocido que la ACh, la 5-HT y el GABA también activan receptores metabotrópicos (mACh, 5-HT₁₋₇ GABA_B) en neuronas entéricas (Cherubini and North 1984, 1985; Krantis 2000). La activación de estos receptores podría conducir a la activación de proteínas G, segundos mensajeros, la activación de proteínas cinasas, y fosforilación de proteínas. Por lo tanto, una

posibilidad es que al menos parte de la oclusión de corriente observada pueda ser mediada por la activación de receptores metabotrópicos.

La oclusión de corriente es aún observada después de inhibir la fosforilación de proteínas (Fig. 15) y aún cuando se baja la temperatura a 11°C o 10°C o por la adición de inhibidores no específicos de proteínas cinasas (estaurosporina 5 μ M) en la solución interna (Ruegg and Burgess 1989)

Los receptores nicotínicos al igual que los serotoninérgicos, son permeables a Ca^{2+} , lo cual sugiere que la oclusión de corriente es por el incremento en la concentración de este ion. En contra de esta hipótesis, sin embargo, está el hecho de que la oclusión de la corriente es aún observada en la ausencia total de iones Ca^{2+} en el medio intracelular y extracelular (Fig. 15A-B). Estos experimentos fueron realizados con una solución estándar interna que no contenía Ca^{2+} y estaba suplementada con EGTA 50 μ M.

g. La oclusión de corriente requiere la activación de receptores con un flujo iónico neto a través de ellos

Para investigar el papel del flujo iónico neto a través de los receptores, observamos los efectos de GABA sobre I_{5-HT} (n=6) y de 5-HT sobre I_{GABA} (n=5) al potencial de inversión de I_{GABA} y de I_{5-HT} , respectivamente. A este potencial, el movimiento iónico a través de un receptor se espera que sea a su más bajo nivel. El primer juego de experimentos fue realizado con una baja concentración de iones Na^+ por la sustitución de NaCl 154 mM con cloruro de N-metil-D-glucamina 154 mM, mientras que las concentraciones de NaCl y CsCl fueron incrementadas a 7 mM cada uno en la solución externa.

Con esta solución el potencial de inversión para I_{5-HT} fue de -45 ± 2 mV y 5-HT no modificó la I_{GABA} (Fig. 16A y 16C). El segundo juego de experimentos fue realizado con una baja concentración interna de iones cloruro y por la sustitución de CsCl 160 mM con gluconato de cesio 155 más CsCl 5 mM en la solución de la pipeta. Con esta solución el potencial de inversión experimental para I_{GABA} fue de -63 ± 1 mV y la amplitud y la cinética de I_{5-HT} fue similar a las observadas con las soluciones estándares. En el potencial de inversión para I_{GABA} GABA no modificó la I_{GABA} (Fig. 16A y 16C). En total, estas observaciones junto con las descritas en el párrafo anterior indican que la oclusión de corriente es mediada por un mecanismo post-receptor. Estos datos también descartan la posibilidad de que la oclusión sea mediada por moléculas de 5-HT actuando sobre los receptores $GABA_A$ (efecto ya demostrado para 5-HT sobre los receptores nACh (Barajas-Lopez y *col.* 2001). Además, los datos indican que la inhibición cruzada entre los receptores $GABA_A$ y los $5-HT_3$ requiere de un flujo iónico neto a través de ellos y que este no es suficiente para activar dichos receptores.

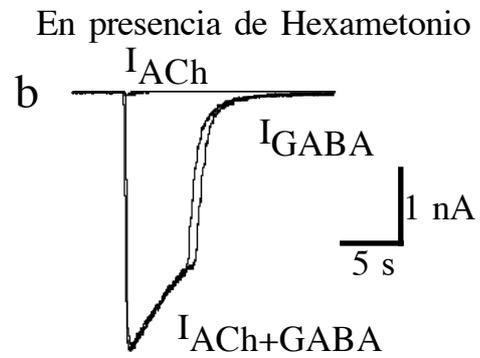
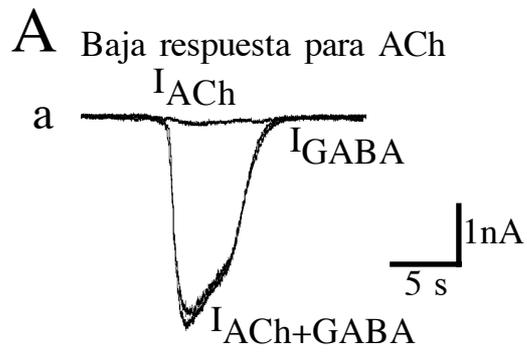
h. La oclusión de corriente presente entre los receptores $GABA_A$ y los $5-HT_3$ es dependiente de la concentración

Los receptores metabotrópicos son activados por concentraciones nanomolares y concentraciones micromolares de GABA y 5-HT (Cherubini and North 1984, 1985; Galligan y *col.* 1988; Wang y *col.* 1996; Gershon 1999; Krantis 2000), por tanto, la oclusión de corriente podría estar presente a concentraciones micromolares si estos receptores están involucrados. Sin embargo, observamos que las corrientes inducidas por una concentración de

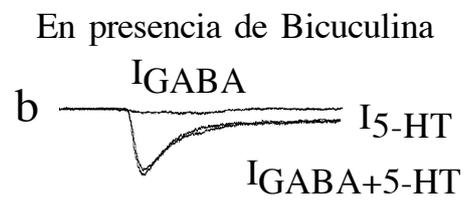
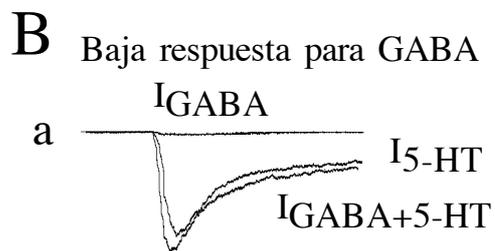
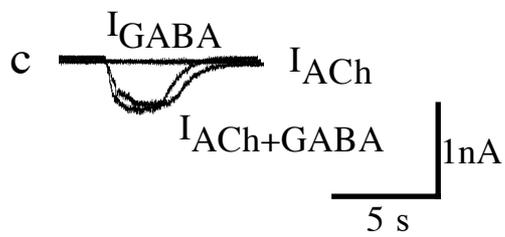
5-HT 30 μM y GABA 30 μM , fueron aditivas ($n=6$; Fig. 17), indicando que la oclusión de corriente no es mediada por la activación de receptores metabotrópicos.

Los receptores 5-HT₃ pueden ser permeables a Ca^{2+} y por lo tanto, alcanzar la concentración de este ión podría ser el responsable de esta oclusión de corriente. Sin embargo, opuesto a esta hipótesis, la oclusión de corriente fue aún observada cuando el Ca^{2+} estuvo ausente en las soluciones intracelular y extracelular (Fig. 15).

Figura 14. Las interacciones inhibitoras entre los receptores GABA_A y nACh y entre los GABA_A y los 5-HT₃ requieren la presencia de receptores funcionales. A, a: registro de una neurona en la cual ACh indujo sólo una pequeña corriente inicial (I_{ACh}), indicando pocos receptores nACh funcionales en esta célula, pero con una prominente respuesta para I_{GABA} . Nótese que ACh no modificó ni la cinética ni la amplitud de I_{GABA} . **b:** resultados similares fueron obtenidos cuando los receptores nACh fueron bloqueados con hexametonio (1 mM). Los registros de **a** y **b** son de dos neuronas diferentes, a un potencial de membrana de -60 mV. **c:** registros de una neurona en la cual GABA indujo sólo una pequeña corriente inicial (I_{GABA}), indicando pocos receptores funcionales tipo GABA_A, pero con respuesta a I_{ACh} . En estas condiciones, GABA no modificó ni la amplitud ni la cinética de I_{ACh} . Antagonistas de los receptores GABA_A (bicuculina; 30 μ M y picrotoxina; 1 mM) también afectaron I_{ACh} (85 and 61%, respectivamente) por lo cual no se pudo bloquear específicamente I_{GABA} . **B, a:** Registros de una neurona en el cual 5-HT induce una prominente corriente entrante (I_{5-HT}) pero GABA no indujo ninguna corriente (I_{GABA}). Observe que cuando ambos agonistas fueron aplicados simultáneamente, GABA no alteró ni la amplitud ni la cinética de I_{5-HT} . Resultados similares fueron obtenidos cuando I_{GABA} fue bloqueada por bicuculina 30 μ M (**b**). **c:** trazos de una neurona que muestra una prominente I_{GABA} no respondió a la aplicación de 5-HT. Observe que 5-HT no modificó I_{GABA} . **d:** Observaciones similares fueron obtenidas cuando I_{5-HT} fue inhibida por ondansetron 3 μ M.



Baja respuesta para GABA



Baja respuesta para 5-HT

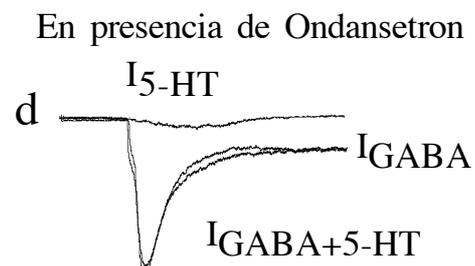
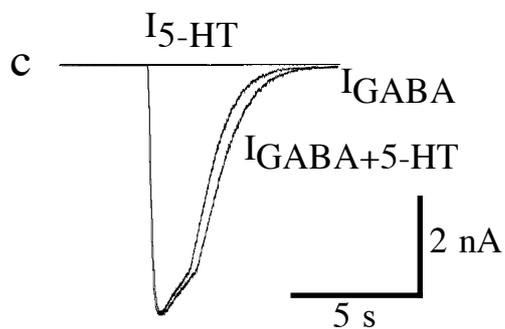


Figura 15. Los iones calcio y actividad de la fosforilación de proteínas no son requeridos para la oclusión de corriente. A: Amplitud promedio de las corrientes entrantes inducidas por la aplicación de GABA (I_{GABA}), ACh (I_{ACh}) o GABA+ACh ($I_{\text{GABA+ACh}}$) en tres grupos experimentales diferentes de neuronas mientéricas. Cada par de barras representa datos de un grupo de células. La primera barra de cada par es una barra combinada y muestra el promedio de I_{ACh} y I_{GABA} antes de la aplicación de GABA+ACh. Esta barra combinada, entonces, representa el promedio de la corriente esperada ($I_{\text{Esperada}} = I_{\text{GABA}} + I_{\text{ACh}}$). La segunda barra representa el promedio de $I_{\text{GABA+ACh}}$. Las líneas arriba de las barras son el S.E.M. para I_{Esperada} y $I_{\text{GABA+ACh}}$. Cinco experimentos fueron realizados enfriando la solución externa a 10°C. Los experimentos libres de Ca^{2+} fueron realizados 0- Ca^{2+} más EGTA 50 μM en el medio extracelular con la solución intracelular estándar ($n=7$). Los experimentos con inhibidores de las proteínas cinasas (PK) fueron realizados usando la solución interna estándar más estaurosporina (5 μM), $n=5$. **B:** Muestra experimentos análogos a los de **A**, solo que en éste caso se utilizaron GABA y 5-HT como agonistas. Todos los experimentos se realizaron a un potencial de membrana de -60 mV.

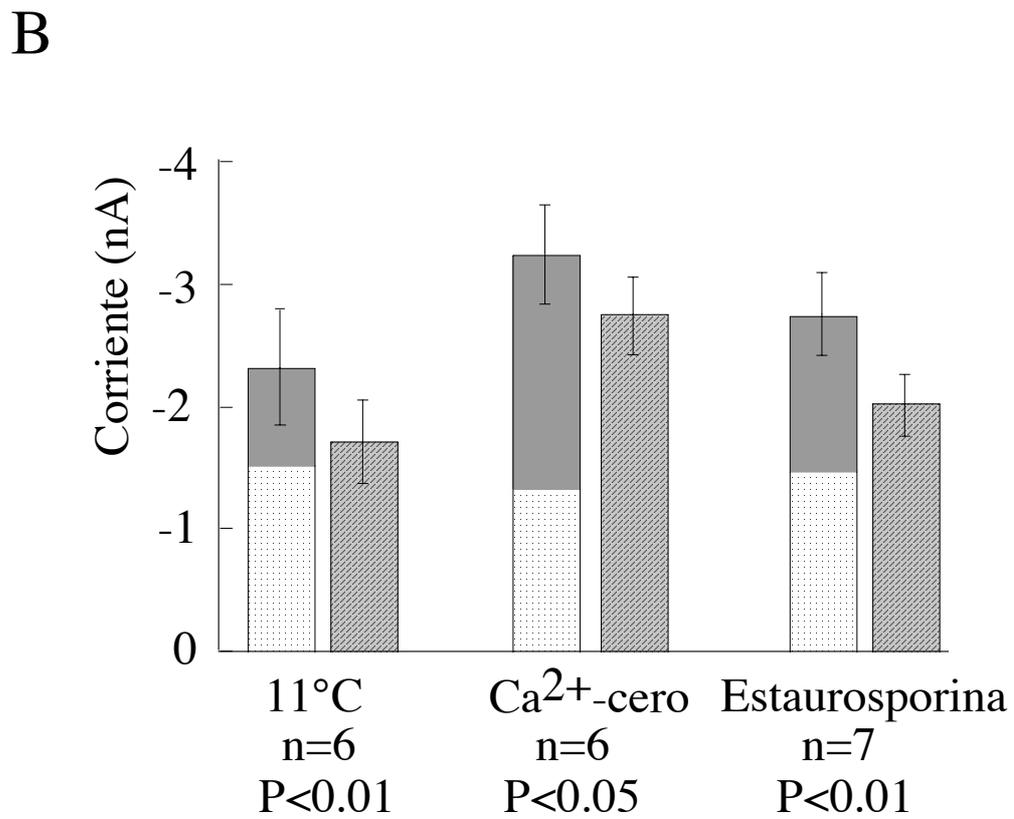
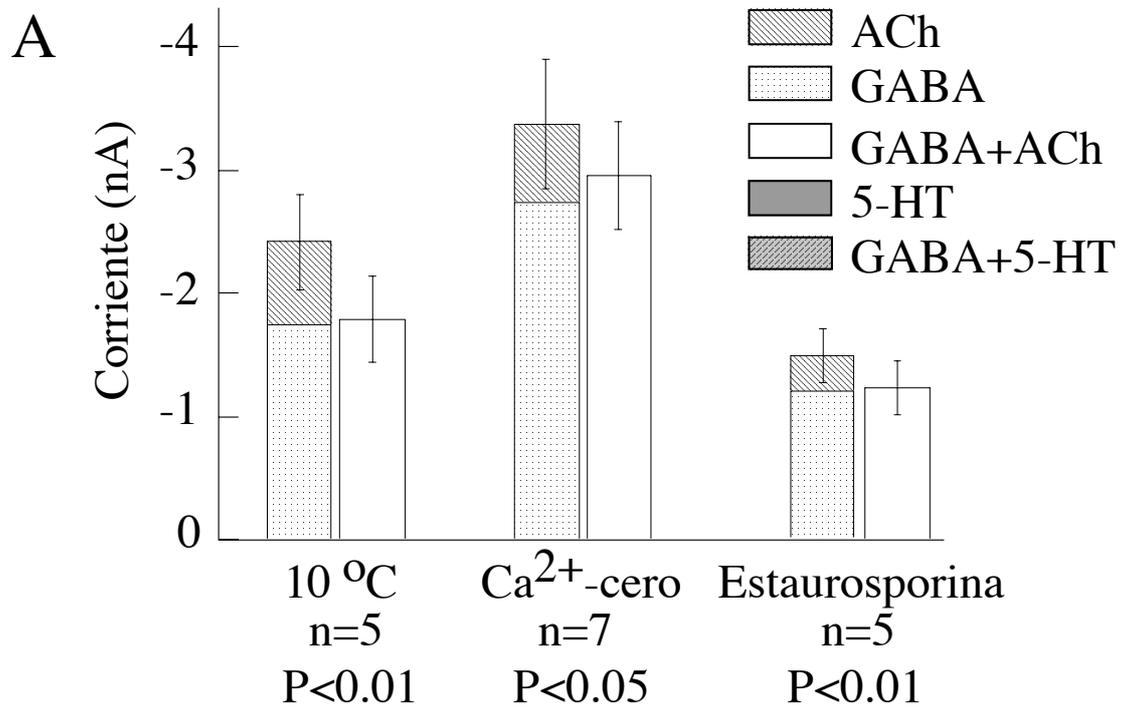


Figura 16. La oclusión de corriente requiere del un flujo iónico neto a través de los receptores. A: La 5-HT no afecta la cinética ni la amplitud de I_{GABA} al potencial de inversión de I_{GABA} . Similarmente **(B)**, GABA no afecta la I_{5-HT} al potencial de inversión de I_{GABA} . Estas dos series de registros son de dos diferentes neuronas mientéricas y fueron realizados con una baja concentración de cloruro en la solución de la pipeta **(B)** o con baja concentración de sodio en la solución externa más concentraciones iguales de Na^+ y Cs^+ en la solución de la pipeta **(A)**. **(C)** valores promedio (barras) de I_{GABA} , I_{5-HT} y $I_{GABA+5-HT}$ de seis y cinco diferentes experimentos (como se indica). Las líneas arriba de las barras representan el S.E.M., el potencial de inversión (E_{rev}) indicado para cada corriente fue medido experimentalmente en cada neurona y los promedios son indicados.

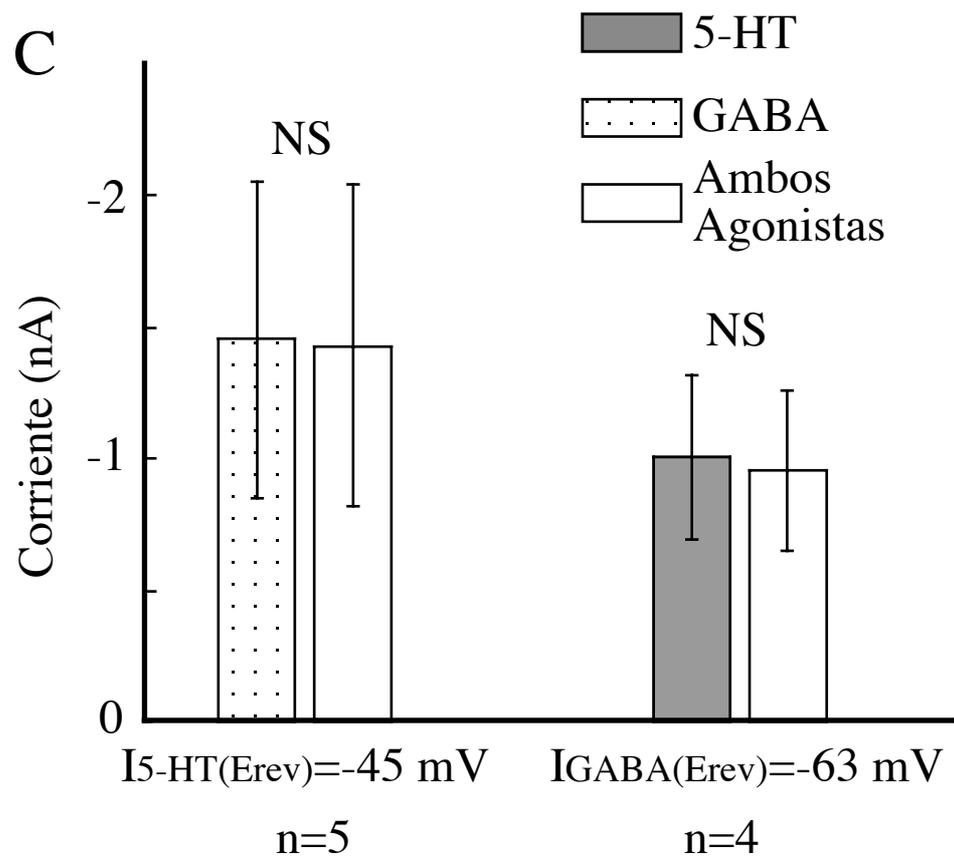
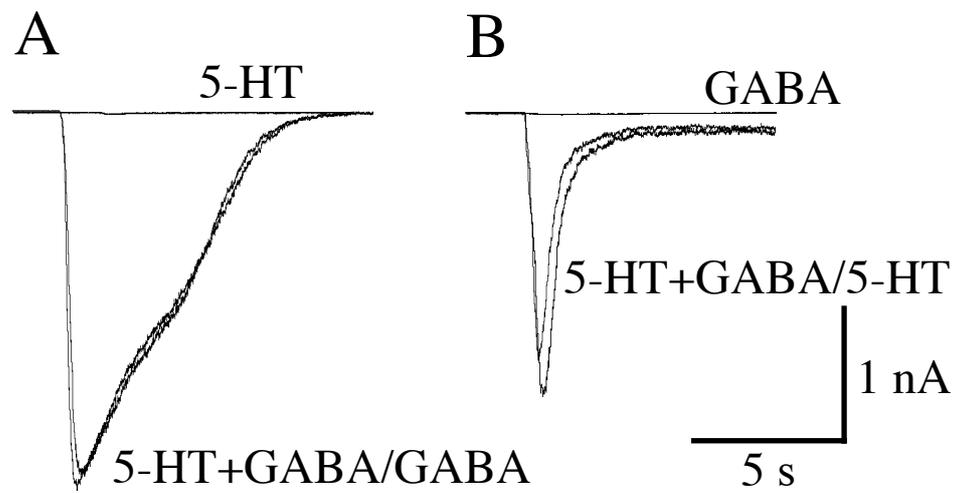
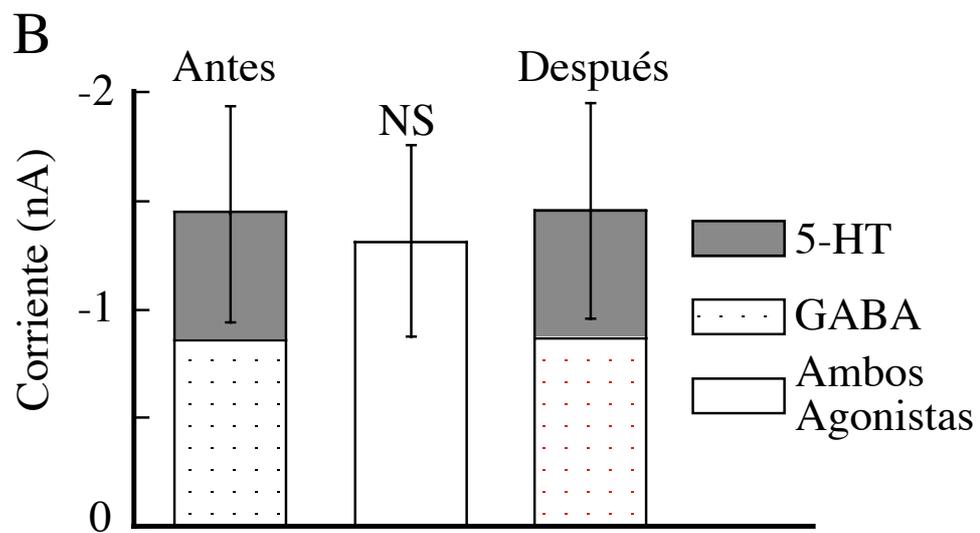
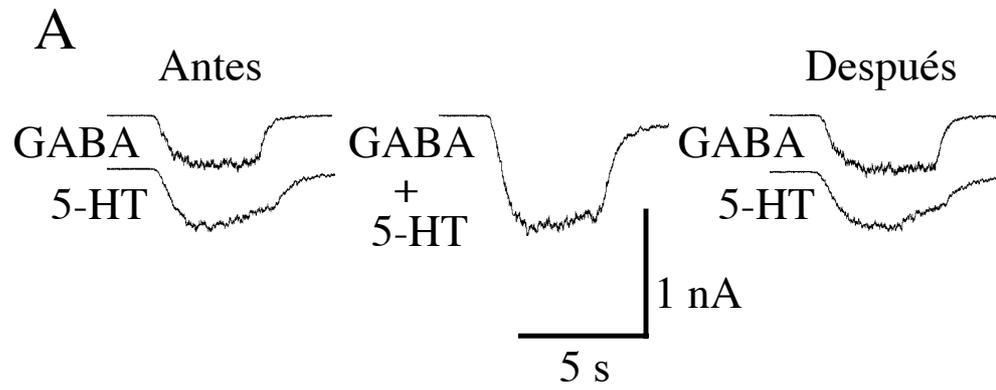


Figura 17. La oclusión de corriente no es observada a baja concentración de los agonistas. A: las corrientes inducidas por la aplicación de GABA (30 μ M), 5-HT (30 μ M) o por GABA+5-HT registras de una misma neurona entérica. **B:** Las barras indican los promedios de las corrientes de membrana y las líneas indican el S.E.M. de seis experimentos similares. En estos experimentos $I_{\text{GABA+5-HT}}$ no fue significativamente diferente (NS) de la suma de las corrientes individuales.



VIII. Discusión

Este es uno de los primeros estudios que demuestran las interacciones entre miembros de la familia *Cys-Loop*, lo cual podría sugerir la existencia de interacciones inhibitoras entre la misma población de LGIC (p.e. entre los mismos receptores GABA_A). Por otro lado, tenemos que esta es la primera demostración de que la activación de los receptores GABA_A y nACh y los GABA_A y 5-HT₃ no es independiente y la corriente iónica llevada a través de estos pares de receptores es ocluida cuando los canales son simultáneamente activados.

Las corrientes de célula completa inducidas por ACh (1 mM) GABA (0.3 mM) o 5-HT (1 mM), a pesar de éstas relativamente altas concentraciones, son mediadas por receptores farmacológicamente distintos. Esto está demostrado por los efectos inhibitoras específicos del hexametonio (bloqueador de los receptores nicotínicos) sobre I_{ACh} , ondasetron (un antagonista del receptor 5-HT₃; (Hoyer y *col.* 1994) sobre I_{5-HT} , y por el efecto más potente de la bicuculina (antagonista de GABA_A; (Li y *col.* 2003) sobre I_{GABA} que sobre I_{ACh} o I_{5-HT} .

Sin embargo, la activación de estos receptores no es independiente como se muestra por el hecho de que las corrientes entrantes llevadas a través de los receptores GABA_A y 5-HT₃ o de GABA_A y nACh no fueron aditivas cuando estos pares de receptores son máximamente activadas. Se desconoce si ACh, GABA o 5-HT pueden alcanzar estas concentraciones relativamente altas durante la transmisión sináptica pero la concentración de glutamato parece ser suficiente para saturar los receptores NMDA en las

sinapsis centrales (Clements y col. 1992). Las concentraciones aquí utilizadas están ligeramente debajo de concentraciones saturables.

La oclusión de corriente observada ocurre tan pronto como las corrientes son activadas, y no requiere de Ca^{2+} o de fosforilación proteica. En conjunto, estas observaciones sugieren que esta oclusión de corriente es mediada por una inhibición cruzada y por la interacción directa entre los receptores $GABA_A$ y nACh, y los $GABA_A$ y $5-HT_3$. Entre los receptores nACh y P2X se reportaron interacciones similares a las observadas en este trabajo (Barajas-Lopez y col. 1998; Zhou and Galligan 1998; Khakh y col. 2000), entre los receptores $5-HT_3$ y P2X (Barajas-Lopez y col. 2002), y también entre los receptores $GABA_A$ y P2X (Sokolova y col. 2001; Karanjia y col. 2006). Interacciones alostéricas entre receptores metabotrópicos también han sido reportadas, por ejemplo entre receptores dopaminérgicos (D2) y somatostatinérgicos (SSTR5) (Rocheville y col. 2000); y entre receptores metabotrópicos y LGIC, como entre los receptores a la dopamina (D5) y $GABA_A$ (Liu y col. 2000). Hemos estudiado la interacción funcional entre los receptores $5-HT_3$ y los nAChRs, y encontramos que esta interacción es diferente, ya que la 5-HT bloquea las corrientes nicotínicas en las neuronas entéricas (Barajas-Lopez y col. 2001).

Zhou y Galligan en 1998, reportan la falta de oclusión entre I_{GABA} y I_{ACh} en neuronas mientéricas del intestino delgado completo. Sin embargo, nosotros encontramos que estas corrientes son oclusivas en neuronas mientéricas de yeyuno e íleon. Una posible explicación para estos hallazgos contradictorios es que diferentes subtipos de receptores podrían estar expresados en sus cultivos neuronales debido a que ellos registran neuronas

hasta 2 semanas después de sembrar el cultivo de cobayo recién nacido, mientras que nosotros usamos cobayo joven y cultivos neuronales hasta 80 h después de sembrarlas.

a. La inhibición cruzada entre los receptores *Cys-Loop* es mediada por la interacción directa entre estos receptores

Las neuronas entéricas también expresan receptores metabotrópicos activados por GABA, ACh y 5-HT (Cherubini and North 1984, 1985; Derkach *et al.* 1989; Zhou and Galligan 2000), los cuales son conocidos por unirse a segundos mensajeros y activar cascadas bioquímicas que involucran la activación de fosforilación de proteínas. Varias de nuestras observaciones, sin embargo, indican que la activación de estos receptores no es requerida para que la oclusión de corriente sea observada. Primero, la oclusión de corriente ocurre tan pronto como los receptores GABA_A, nACh y 5-HT₃ son activados, indicando que esta oclusión de corriente es tan rápida como la activación. Segundo, la bicuculina previene los efectos de GABA sobre los receptores 5-HT₃ y el ondansetron previene los efectos de 5-HT sobre los receptores GABA_A. Tercero, la inhibición de la fosforilación de proteínas (con estaurosporina o bajando la temperatura experimental a 10-11°C) no evitó la oclusión de corriente observada.

b. Las corrientes inducidas por la aplicación simultánea de ambos agonistas son llevadas a través de ambos receptores *Cys-Loop*

Varias observaciones indican que $I_{\text{GABA}+5\text{-HT}}$ es mediada por la apertura de los receptores GABA_A y 5-HT₃. 1) $I_{\text{GABA}+5\text{-HT}}$ desensibiliza más rápido que

I_{GABA} pero más lentamente que I_{5-HT} . 2) la caída de $I_{GABA+5-HT}$ se parece a la caída de ambas I_{GABA} y de I_{5-HT} . 3) cuando GABA y 5-HT son aplicados simultáneamente ambos receptores $GABA_A$ y $5-HT_3$ son desensibilizados, mientras que no se observó desensibilización cruzada cuando $GABA_A$ y $5-HT_3$ fueron desensibilizados individualmente. También encontramos que cuando GABA y ACh son aplicados simultáneamente, ambos receptores $GABA_A$ y nACh son desensibilizados, mientras que no se observó desensibilización cruzada cuando los receptores $GABA_A$ y nACh se desensibilizaron individualmente. Todos juntos, estas observaciones implican que la inhibición entre estos receptores *Cys-Loop* es recíproca.

c. Implicaciones funcionales para las interacciones entre estos receptores

La información experimental hasta ahora descrita sugiere que las interacciones inhibitoras entre los receptores activados por ligando podrían usar un amplio mecanismo para limitar la corriente iónica a través de la membrana celular. De esta manera tales interacciones funcionales como las demostradas aquí han sido mostradas entre receptores P2X y receptores nicotínicos en neuronas entéricas (Barajas-Lopez y *col.* 1998; Zhou and Galligan 1998) y entre P2X y otros receptores activados por ligando ($GABA_A$) en neuronas entéricas (Karanjia y *col.* 2006), y en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Sokolova y *col.* 2001).

El presente estudio, y el de Li *et al.* (Li y *col.* 2003) muestran que dos miembros estructuralmente relacionados (Ortells and Lunt 1995) pueden interactuar indicando que los mismos tipos de canal (p.e. ACh) podrían

también mantener interacciones inhibitoras entre ellos mismos. Esto implicaría que este tipo de interacciones jugarían un papel esencial en la integración sináptica. Así, las interacciones entre canales de la misma población podrían limitar las corrientes originadas durante la activación sináptica. Esto es de particular importancia si consideramos que la concentración de ciertos neurotransmisores es suficientemente alta como para saturar sus receptores postsinápticos (Clements y *col.* 1992) y que estos se localizan en una alta densidad (Kandel 2000). Claro que ambas características mantienen una alta eficiencia sináptica pero al mismo tiempo originan un cierto riesgo de sobre estimulación de la célula postsináptica. Es aquí donde las interacciones descritas podrían limitar la estimulación al mantener una inhibición cruzada entre canales vecinos. Lo cual aseguraría la transmisión sináptica pero disminuiría el riesgo de sobre estimulación. Si por alguna razón uno de los receptores interactuantes dejase de funcionar esto no afectaría la transmisión sináptica ya que el canal vecino funcionaría.

En conclusión, nuestros resultados indican que hay una interacción inhibitora rápida entre los receptores GABA_A y nACh y entre los receptores GABA_A y 5-HT₃. Estas interacciones ocurren tan rápido como la activación de estos receptores. Además, esta interacción inhibitora parece estar mediada por el flujo iónico a través de ellos, apoyando la hipótesis de que estos receptores están localizados muy cerca uno del otro en la membrana neuronal y, quizá formando unidades funcionales constituidas por al menos un receptor de cada tipo. El hecho que los receptores *Cys-Loop* estudiados aquí están estructuralmente relacionados sugiere que este tipo de interacciones podrían también suceder entre receptores del mismo tipo, lo

cual implicaría un importante papel en el señalamiento neuronal para este tipo de interacciones. En particular porque la mayor densidad de LGIC se encuentra frente a los sitios que liberan el neurotransmisor (Kandel 2000).

IX. Referencias

1. Barajas-Lopez C, Huizinga JD, Collins SM, Gerzanich V, Espinosa-Luna R and Peres AL. P2x-purinoceptors of myenteric neurones from the guinea-pig ileum and their unusual pharmacological properties. *Br J Pharmacol* 119: 1541-1548, 1996.
2. Barajas-Lopez C, Espinosa-Luna R and Zhu Y. Functional interactions between nicotinic and P2X channels in short-term cultures of guinea-pig submucosal neurons. *J Physiol* 513 (Pt 3): 671-683, 1998.
3. Barajas-Lopez C, Espinosa-Luna R and Christofi FL. Changes in intracellular Ca²⁺ by activation of P2 receptors in submucosal neurons in short-term cultures. *Eur J Pharmacol* 409: 243-257, 2000.
4. Barajas-Lopez C, Karanjia R and Espinosa-Luna R. 5-Hydroxytryptamine and atropine inhibit nicotinic receptors in submucosal neurons. *Eur J Pharmacol* 414: 113-123, 2001.
5. Barajas-Lopez C, Montano LM and Espinosa-Luna R. Inhibitory interactions between 5-HT₃ and P2X channels in submucosal neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G1238-1248, 2002.
6. Barnes JM, Barnes NM, Champaneria S, Costall B and Naylor RJ. Characterisation and autoradiographic localisation of 5-HT₃ receptor recognition sites identified with [³H]-(*S*)-zacopride in the forebrain of the rat. *Neuropharmacology* 29: 1037-1045, 1990.
7. Barry PH and Lynch JW. Ligand-gated channels. *IEEE Trans Nanobioscience* 4: 70-80, 2005.
8. Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'homme JF, Baulac M, Brice A, Bruzzone R and LeGuern E. First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* 28: 46-48, 2001.
9. Benwell ME, Balfour DJ and Anderson JM. Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)-[³H]nicotine binding sites in human brain. *J Neurochem* 50: 1243-1247, 1988.
10. Boue-Grabot E, Barajas-Lopez C, Chakfe Y, Blais D, Belanger D, Emerit MB and Seguela P. Intracellular cross talk and physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels. *J Neurosci* 23: 1246-1253, 2003.
11. Breese CR, Marks MJ, Logel J, Adams CE, Sullivan B, Collins AC and Leonard S. Effect of smoking history on [³H]nicotine binding in human postmortem brain. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 7-13, 1997.
12. Cherubini E and North RA. Actions of gamma-aminobutyric acid on neurones of guinea-pig myenteric plexus. *Br J Pharmacol* 82: 93-100, 1984.
13. Cherubini E and North RA. Benzodiazepines both enhance gamma-aminobutyrate responses and decrease calcium action potentials in guinea-pig myenteric neurones. *Neuroscience* 14: 309-315, 1985.
14. Christofi FL, Guan Z, Wood JD, Baidan LV and Stokes BT. Purinergic Ca²⁺ signaling in myenteric neurons via P2 purinoceptors. *Am J Physiol* 272: G463-473, 1997.
15. Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE and Westbrook GL. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258: 1498-1501, 1992.

16. Conley e. *the ion channel, extracellular ligand-gated channels*. New York: Academic press, 1996.
17. Connolly CN and Wafford KA. The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc Trans* 32: 529-534, 2004.
18. Demuro A, Palma E, Eusebi F and Miledi R. Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by bicuculline. *Neuropharmacology* 41: 854-861, 2001.
19. Derkach V, Surprenant A and North RA. 5-HT₃ receptors are membrane ion channels. *Nature* 339: 706-709, 1989.
20. Erkkila BE, Weiss DS and Wotring VE. Picrotoxin-mediated antagonism of alpha3beta4 and alpha7 acetylcholine receptors. *Neuroreport* 15: 1969-1973, 2004.
21. Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM and Luscher B. Postsynaptic clustering of major GABA_A receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1: 563-571, 1998.
22. Futami T, Takakusaki K and Kitai ST. Glutamatergic and cholinergic inputs from the pedunculopontine tegmental nucleus to dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta. *Neurosci Res* 21: 331-342, 1995.
23. Galligan JJ, Surprenant A, Tonini M and North RA. Differential localization of 5-HT₁ receptors on myenteric and submucosal neurons. *Am J Physiol* 255: G603-611, 1988.
24. Galligan JJ. Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 14: 611-623, 2002.
25. Gentry CL and Lukas RJ. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1: 359-385, 2002.
26. Gershon MD. Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment Pharmacol Ther* 13 Suppl 2: 15-30, 1999.
27. Gillis KD, Pun RY and Mislis S. Single cell assay of exocytosis from adrenal chromaffin cells using "perforated patch recording". *Pflugers Arch* 418: 611-613, 1991.
28. Grutter T and Changeux JP. Nicotinic receptors in wonderland. *Trends Biochem Sci* 26: 459-463, 2001.
29. Hammond. *Cellular and Molecular Neurobiology*. Paris, France: Academic Press, 1996.
30. Hefft S, Hulo S, Bertrand D and Muller D. Synaptic transmission at nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal organotypic cultures and slices. *J Physiol* 515 (Pt 3): 769-776, 1999.
31. Hope AG, Downie DL, Sutherland L, Lambert JJ, Peters JA and Burchell B. Cloning and functional expression of an apparent splice variant of the murine 5-HT₃ receptor A subunit. *Eur J Pharmacol* 245: 187-192, 1993.
32. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR and Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46: 157-203, 1994.

33. Jensen ML, Schousboe A and Ahring PK. Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *J Neurochem* 92: 217-225, 2005.
34. Johnson BA. Role of the serotonergic system in the neurobiology of alcoholism: implications for treatment. *CNS Drugs* 18: 1105-1118, 2004.
35. Jones DN, Barnes NM, Costall B, Domeney AM, Kilpatrick GJ, Naylor RJ and Tyers MB. The distribution of 5-HT₃ recognition sites in the marmoset brain. *Eur J Pharmacol* 215: 63-67, 1992.
36. Kandel E, Schwartz, JH., and Jessell TM. *Principles of Neural sciences*. New York: McGraw Hill, 2000.
37. Kao PN and Karlin A. Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J Biol Chem* 261: 8085-8088, 1986.
38. Karanjia R, **Garcia-Hernandez LM**, Miranda-Morales M, Somani N, Espinosa-Luna R, Montano LM and Barajas-Lopez C. Cross-inhibitory interactions between GABAA and P2X channels in myenteric neurones. *Eur J Neurosci* 23: 3259-3268, 2006.
39. Karlin A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3: 102-114, 2002.
40. Khakh BS, Zhou X, Sydes J, Galligan JJ and Lester HA. State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels. *Nature* 406: 405-410, 2000.
41. Kilpatrick GJ, Jones BJ and Tyers MB. Identification and distribution of 5-HT₃ receptors in rat brain using radioligand binding. *Nature* 330: 746-748, 1987.
42. Kilpatrick GJ, Jones BJ and Tyers MB. The distribution of specific binding of the 5-HT₃ receptor ligand [³H]GR65630 in rat brain using quantitative autoradiography. *Neurosci Lett* 94: 156-160, 1988.
43. Krantis A. GABA in the Mammalian Enteric Nervous System. *News Physiol Sci* 15: 284-290, 2000.
44. Lena C, Changeux JP and Mulle C. Evidence for "preterminal" nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. *J Neurosci* 13: 2680-2688, 1993.
45. Li Y, Wu LJ, Legendre P and Xu TL. Asymmetric cross-inhibition between GABAA and glycine receptors in rat spinal dorsal horn neurons. *J Biol Chem* 278: 38637-38645, 2003.
46. Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT and Niznik HB. Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* 403: 274-280, 2000.
47. Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM and Julius D. Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254: 432-437, 1991.
48. Nakazawa K. ATP-activated current and its interaction with acetylcholine-activated current in rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 14: 740-750, 1994.
49. Ortells MO and Lunt GG. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* 18: 121-127, 1995.

50. Reeves DC and Lummis SC. The molecular basis of the structure and function of the 5-HT₃ receptor: a model ligand-gated ion channel (review). *Mol Membr Biol* 19: 11-26, 2002.
51. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC and Patel YC. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 288: 154-157, 2000.
52. Role LW. Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels. *Curr Opin Neurobiol* 2: 254-262, 1992.
53. Ruegg UT and Burgess GM. Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 10: 218-220, 1989.
54. Sargent PB. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16: 403-443, 1993.
55. Sokolova E, Nistri A and Giniatullin R. Negative cross talk between anionic GABA_A and cationic P2X ionotropic receptors of rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 21: 4958-4968, 2001.
56. Sugita S, Shen KZ and North RA. 5-hydroxytryptamine is a fast excitatory transmitter at 5-HT₃ receptors in rat amygdala. *Neuron* 8: 199-203, 1992.
57. Sun H and Machu TK. Bicuculline antagonizes 5-HT(3A) and alpha2 glycine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* 391: 243-249, 2000.
58. Takenouchi T and Munekata E. Serotonin increases cytoplasmic Ca²⁺ concentration in PC12h cells: effect of tachykinin peptides. *Neurosci Lett* 246: 141-144, 1998.
59. Wallace RH, Marini C, Petrou S, Harkin LA, Bowser DN, Panchal RG, Williams DA, Sutherland GR, Mulley JC, Scheffer IE and Berkovic SF. Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet* 28: 49-52, 2001.
60. Wang HY, Fiorica-Howells E, Pan H, Gershon MD and Friedman E. Myenteric ganglionic 5-hydroxytryptamine(1P) signal transmission is mediated via Go protein. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 518-524, 1996.
61. Wessler I, Kirkpatrick CJ and Racke K. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 198-205, 1999.
62. Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20: 92-98, 1997.
63. Zhang M, Wang YT, Vyas DM, Neuman RS and Bieger D. Nicotinic cholinergic-mediated excitatory postsynaptic potentials in rat nucleus ambiguus. *Exp Brain Res* 96: 83-88, 1993.
64. Zhou X and Galligan JJ. Non-additive interaction between nicotinic cholinergic and P2X purine receptors in guinea-pig enteric neurons in culture. *J Physiol* 513 (Pt 3): 685-697, 1998.
65. Zhou X and Galligan JJ. GABA(A) receptors on calbindin-immunoreactive myenteric neurons of guinea pig intestine. *J Auton Nerv Syst* 78: 122-135, 2000.
66. Zimmermann h. *Synaptic transmission, cellular and molecular basis*. Frankfurt am main germany: Gulde druck gmbh, 1993.

X. Anexos

Anexo a.

Protocolo del Cultivo Primario de Neuronas Mientéricas

Anexo b.

Miranda-Morales M, **García-Hernandez LM**, Ochoa-Cortes F, Espinosa-Luna R, Naranjo-Rodriguez EB and Barajas-Lopez C. Cross-talking between 5-HT(3) and GABA(A) receptors in cultured myenteric neurons. *Synapse* 61: 732-740, 2007.

<http://doi.org/10.1002/syn.20411>

Anexo c.

García-Hernandez LM, Miranda-Morales M, Ochoa-Cortes F, Espinosa-Luna R, and Barajas-Lopez C. Inhibitory interactions between nACh and GABAA receptors in myenteric neurons. *Eur. J. Pharmacol.* En preparación.

<http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04861.x>

Anexo a**Protocolo para el Cultivo Primario de Neuronas Mientéricas**

Se sacrifican por decapitación cobayos jóvenes de 150 a 200 g, ya sean machos o hembras, y se extrae un segmento de aproximadamente 5 cm de yeyuno proximal. Se mantiene en solución de Krebs modificada con una composición en mM de: 126 NaCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 5 KCl, 25 NaHCO₃, 11 glucosa; gasificada con 95% O₂ y 5% CO₂.

El tejido se fija por medio de pequeños alfileres de tungsteno a una caja de Petri cubierta por un polímero; la preparación es bañada por la solución de Krebs antes mencionada. El tejido se abre longitudinalmente, la capa mucosa y submucosa se diseca, se remueve la mayoría del músculo circular, quedando el plexo mientérico embebido en el músculo longitudinal.

La preparación se disocia usando un tratamiento secuencial con dos soluciones enzimáticas. Primero, el tejido se incuba a 37°C durante 10 min en una solución de papaína (0.01 mL/mL) con L-cisteína (0.4 mg/mL), posteriormente se lava con medio L-15 y se prosigue con la segunda incubación (37°C; 10 min) usando una solución de colagenasa (1 mg/mL) y dispasa (4 mg/mL). Las enzimas se remueven lavando con medio L-15. El tejido es disgregado utilizando una pipeta Pasteur y se prosigue a una tercera incubación (37°C; 10 min), nuevamente se disgrega el tejido pero esta vez hasta observar sólo pequeños fragmentos. Esta suspensión celular se centrifuga a 600 rpm durante 5 minutos y se resuspende en el medio de alimentación. Las células se siembran en cubreobjetos redondos cubiertos con colagena estéril de cola de rata (preparada en nuestro laboratorio) contenidos en una caja de cultivo. Las células se mantienen a 37°C con una

atmósfera de 95% de O₂ y 5% de CO₂. No consideramos la densidad celular ya que, nuestro cultivo también contiene músculo circular y longitudinal, además de que necesitamos agrupamientos de células y no células únicas para realizar nuestros registros. El medio de cultivo contenía 97.5% de medio mínimo esencial, 2.5% de suero de cobayo (casero), L-glutamina 2 mM, penicilina 10 U/mL, estreptomina 10 µg/mL y glucosa 15 mM.

Cross-Talking Between 5-HT₃ and GABA_A Receptors in Cultured Myenteric Neurons

MARCELA MIRANDA-MORALES,¹ LUZ M. GARCÍA-HERNÁNDEZ,¹ FERNANDO OCHOA-CORTÉS,¹
ROSA ESPINOSA-LUNA,¹ ELIA B. NARANJO-RODRÍGUEZ,² AND CARLOS BARAJAS-LÓPEZ^{1,3*}

¹Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP, México

²Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, México D.F, México

³Department of Anatomy and Cell Biology, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada

KEY WORDS γ -aminobutyric acid; serotonin (5-HT); neurotransmitters; protein interactions; ligand-gated ion channels; *cys-loop* receptor superfamily; myenteric neurons; 5-HT₃ receptors; GABA_A receptors

ABSTRACT We recorded whole-cell ion currents induced by γ -aminobutyric acid (I_{GABA}) and serotonin (I_{5-HT}) to investigate and characterize putative interactions between GABA_A and 5-HT₃ receptors in myenteric neurons from the guinea pig small intestine. I_{GABA} and I_{5-HT} were inhibited by bicuculline and ondansetron, respectively. Currents induced by the simultaneous application of both, GABA and 5-HT ($I_{GABA+5-HT}$) were significantly lower than the sum of I_{GABA} and I_{5-HT} , indicating the existence of a current occlusion. Such an occlusion was observed when GABA_A and 5-HT₃ receptors are virtually saturated. Kinetics, and pharmacological properties of $I_{GABA+5-HT}$ indicate that they are mediated by activation of both, GABA_A and 5-HT₃ channels. GABA did not alter I_{5-HT} in neurons without GABA_A channels, in the presence of bicuculline (a GABA_A receptor antagonist) or at the reversal potential for I_{GABA} . Similarly, 5-HT did not modify I_{GABA} in neurons in which 5-HT₃ channels were absent, after inhibiting 5-HT₃ channels with ondansetron (a 5-HT₃ receptor antagonist) or at the reversal potential for I_{5-HT} . Current occlusion was observed as soon as GABA_A and 5-HT₃ channels were being activated, in the absence of Ca²⁺, at low temperature (11°C), and after adding staurosporine (a protein kinase inhibitor) to the pipette solution. Our proposal is that GABA_A and 5-HT₃ channels are organized in clusters and within these, both channels can cross-inhibit each other, likely by allosteric interactions between these proteins. **Synapse 61:732–740, 2007.** © 2007 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

The neurotransmitters serotonin (5-HT) and γ -aminobutyric acid (GABA) activate GABA_A (chloride), and 5-HT₃ (cationic) channels, respectively, and mediate synaptic transmission (DeFeudis, 1990; Sugita et al., 1992). Such receptors are part of the *Cys-loop* ligand-gated ion channel superfamily. Each channel of this superfamily is formed by five subunits (Cockcroft et al., 1990; Ortells and Lunt, 1995). Twenty different GABA_A subunits have been cloned whereas for 5-HT₃ subunits only three have been cloned (Reeves and Lummis, 2002). Each subunit has four transmembrane domains and the carboxy and amino terminals are extracellular. Experimental evidence indicates that 5-HT₃ subunits form homomeric and heteromeric channels while the GABA_A channels are often heteropentamers.

Various studies carried out in peripheral neurons have demonstrated that P2X native channels can es-

tablish an inhibitory interaction with members of the *Cys-loop* ligand-gated channels superfamily. In particular, with nicotinic channels (nACh) (Barajas-López et al., 1998; Khakh et al., 2000; Nakazawa, 1994; Zhou and Galligan, 1998), with 5-HT₃ channels (Barajas-López et al., 2002; Boue-Grabot et al., 2003), and with GABA_A channels (Karanjia et al., 2006; Sokolova et al., 2001). This inhibitory interaction is very fast and might be mediated by an allosteric interaction between P2X and the mentioned *Cys-loop* ligand-gated channels. In favor of this hypothesis, P2X₂ and the $\alpha_4\beta_2$ nACh channels appear to form complexes,

*Correspondence to: Carlos Barajas-López, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a Sección, SLP, CP78216, México. E-mail: cbarajas@ipicyt.edu.mx

Received 18 September 2006; Accepted 20 February 2007

DOI 10.1002/syn.20411

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Cross-Inhibitory Interactions Between GABA_A and nACh Channels in Myenteric Neurons

Luz M. García-Hernández¹, Marcela Miranda-Morales¹, Fernando Ochoa-Cortés¹, Rosa Espinosa-Luna¹, and Carlos Barajas-López^{1,2}

¹*Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP, México*

²*Department of Anatomy & Cell Biology, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada*

Keywords

γ -Aminobutyric acid (GABA); acetylcholine (ACh); neurotransmitters; enteric nervous system; ligand-gated ion channels; *Cys-loop* receptor superfamily

Abstract γ -Aminobutyric acid (GABA) and acetylcholine (ACh) play an important function as neurotransmitters by directly activating GABA_A and nACh receptors on the postsynaptic membrane. These receptors are ligand-gated channels and belong to the *Cys-loop* superfamily. Various members of this superfamily of receptors maintain cross-inhibitory interactions with P2X receptors. In this study, we characterize the inhibitory interactions between native GABA_A and nACh receptors of myenteric neurons from the guinea-pig small intestine. Whole-cell currents induced by the application of high concentrations of GABA (I_{GABA}), ACh (I_{ACh}), and by GABA+ACh ($I_{\text{GABA+ACh}}$). It was found that GABA and ACh open two different channel populations, which, however, are not functionally independent because currents carried through them are occluded when both channels are simultaneously activated, revealing a current occlusion. This occlusion is observed as soon as channels are activated and $I_{\text{GABA+ACh}}$ are carried through both GABA_A and nACh channels. Furthermore, several experimental observations indicate that current occlusion does not require Ca^{2+} and other second messengers. Altogether, these observations indicate that current occlusion is mediated by cross-inhibition and a direct interaction between GABA_A and nACh receptors.

Introduction*

γ -Aminobutyric acid (GABA) and acetylcholine (ACh) are known to play a role as neurotransmitters {DeFeudis, 1990 #29}. Acetylcholine is a major neurotransmitter in the sympathetic, parasympathetic, and enteric ganglia {Hirst, 1974 #53; Nishi, 1973 #13; Nishimura, 1997 #55; North, 1985 #18; Surprenant, 1984 #12; Tack, 1992 #54}, meanwhile, GABA is the main inhibitory neurotransmitter in mammalian central nervous system. GABA and ACh open,

GABA_A and nicotinic (nACh) channels on the postsynaptic membrane, which are permeable to chloride and cations, respectively. As other members of the *Cys-loop* receptor superfamily, GABA_A and nACh channels are considered to be formed by five subunits, each subunit is characterized by four transmembrane domains {Cockcroft, 1990 #28; Corringer, 2000 #16; McGehee, 1995 #14; Ortells, 1995 #45; Sargent, 1993 #15}.

Previous studies have shown that activation of nACh and P2X channels (activated by ATP) are not independent and that they can cross-inhibit each other when are simultaneously activated {Barajas-Lopez, 1998 #7; Nakazawa, 1994 #44; Zhou, 1998 #22}. This inhibition occurs rapidly and might be mediated by allosteric interactions between nACh and P2X channels. Recent

* **Corresponding to:** Carlos Barajas-López, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a Secc., SLP, SLP, CP78216, México, Tel: +52(444) 834-2000 ext 2033, Fax: +52(444) 834-2010, Email: cbarajas@ipicyt.edu.mx

Interactions between GABA_A and nACh channels
(en preparación)

experimental evidence supports this hypothesis, thus, P2X₂ and $\alpha_4\beta_2$ channels appear to form complexes, with channels lying ~ 80 Å apart {Khakh, 2005 #56}. Comparable interactions have been shown between P2X and 5-HT₃ receptors of enteric neurons {Barajas-Lopez, 2002 #4; Boue-Grabot, 2003 #3}, and between P2X and GABA_A receptors of neurons from the dorsal root ganglia {Sokolova, 2001 #26}, and enteric neurons {Karanjia, 2006 #1}.

Thus so far, only Li et al., {Li, 2003 #42} and our group {***add reference of Morales-Miranda et al} have reported the existence of similar interactions between GABA_A receptors and two others members of the *Cys-loop* superfamily. Li et al., {Li, 2003 #42} described an asymmetric cross-inhibition between glycine and GABA_A channels, which are both permeable to Cl⁻ in spinal dorsal horn neurons. Miranda-Morales et al., reported the existence of cross-interactions between 5-HT₃ and GABA_A. These findings suggest that GABA_A receptors also cross-interact with nACh receptors. In the present study, we investigated this putative interaction. Our observations indicate that ACh and GABA activate two different channel populations. These channels, however, negatively modulate each other when they are simultaneously activated. This occurs as soon as the channels are activated, and it does not require Ca²⁺ and protein phosphorylation. Altogether, these findings imply that the cross-inhibition between these channels is mediated by direct interactions between these proteins.

Materials and Methods

Young guinea pigs (150-200 g), either male or female, were killed by decapitation and a segment of 5 cm of proximal jejunum was removed, placed in modified Krebs solution (in mM: NaCl 126, NaH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, KCl 5, NaHCO₃ 25, glucose 11; gassed with 95% O₂ and 5% CO₂) and opened longitudinally. The mucosa and submucosal layers of this intestinal segment were dissected, before removing

most of the circular muscle layer leaving behind the longitudinal layer with the myenteric plexus embedded with it.

The myenteric preparation was dissociated using a sequential treatment with two enzymatic solutions, as described in a different place {Barajas-Lopez, 1996 #8}, the first contained papain (0.01 mL/mL; activated with 0.4 mg/mL of L-cysteine) and the second collagenase (1 mg/mL) and dispase (4 mg/mL). The enzymes were removed by washing with L15 medium and the neurons were plated on rounded coverslips coated with sterile rat-tail collagen. Culture medium was minimum essential medium 97.5%, containing 2.5% guinea pig serum, L-glutamine 2 mM, penicillin 10 U/mL, streptomycin 10 µg/mL and glucose 15 mM.

ACh and GABA are known to modulate the membrane potassium channels of enteric neurons via G-protein linked receptors {Barajas-Lopez, 2000 #6; Krantis, 2000 #24}. In order to decrease the involvement of membrane currents other than those mediated by activation of ligand-gated channels, the experiments were carried out in the presence of Cs⁺ (a potassium channel blocker). Furthermore, currents were measured by the whole-cell patch clamp configuration, which is also known to preclude various effects mediated by second messengers {Gillis, 1991 #39}. Membrane currents induced by ACh and GABA were recorded from myenteric neurons in short-term (2-72 hours) primary cultures using an Axopatch 200B amplifier. Patch pipettes were made as previously described {Barajas-Lopez, 1996 #8} and had resistances between 1-3 MΩ. Eighty to ninety-five percent of the series resistance was compensated in 10 neurons of the experiments reported here. Series resistance compensation, however, did not affect the lack of addition of I_{ACh} and I_{GABA} (see Results), so in most cases no compensation was made for this factor. Except when otherwise mentioned the holding potential was -60 mV. The standard solutions used, unless otherwise

Interactions between GABA_A and nACh channels
(en preparación)

mentioned, had the following compositions (in mM). Inside the pipette: CsCl 160, EGTA 10, HEPES 5, NaCl 10, ATPMg 3, and GTP 0.1; external solution: NaCl 160, CaCl₂ 2, glucose 11, HEPES 5 and CsCl 3. The pH of all solutions was adjusted to 7.3-7.4 with either CsOH (pipette solutions) or NaOH (external solutions). With these standard solutions, the usual input resistance of the neurons ranged from 1 to 10 GΩ. Whole-cell currents were recorded on a PC using Axotape software (Axon Instruments) and analyzed on a Macintosh computer using Axograph software (Molecular Devices). The recording chamber was continuously superfused with external solution at approximately 2 mL/min. Rapid changes in the external solution were made by using an eight-tubes device, with the tubes connected to syringes containing the control and experimental solutions. The tube containing the control solution was placed in front of the cell being recorded and the external application of experimental substances was achieved by abruptly changing this tube for a tube delivering the same solution plus the drug(s). Experimental substances were removed by returning back to the control solution. External solutions were delivered by gravity and the level of the syringes was continuously adjusted to minimize changes in the flow rate. Experiments, unless otherwise stated, were performed at room temperature (~23°C).

GABA, bicuculline and picrotoxin were purchased from Research Biomedical Inc. (Natick, MA, USA). Staurosporine was supplied by Kamiya (Thousand Oaks, CA, USA). All other substances were purchased from Sigma (St. Louis, MO., USA).

Results were expressed as means ± S.E.M. and the number of cells used as *n*. The paired Student's *t*-test was used to evaluate differences between mean values obtained from the same cells and the unpaired Student's *t*-test was used for data obtained from different groups of cells. Two-tailed *P* values of 0.05 or less were considered statistically significant.

RESULTS**Electrophysiological and pharmacological properties of the whole-cell currents induced by GABA and ACh**

Pharmacological and electrophysiological properties of the membrane conductance and whole-cell currents activated by GABA (I_{GABA}) and ACh (I_{ACh}) in enteric neurons have been previously characterized {Cherubini, 1984 #38; Cherubini, 1985 #37; Zhou, 2000 #20}. These whole-cell currents are mediated by activation of channels permeable to chloride (GABA_A) and cations (nACh), respectively.

Using the chloride internal solution, individual applications of GABA and ACh induced inward currents at a holding potential of -60 mV. Concentration-response curves (not shown) were obtained for these transmitters and analyzed (curve of GABA was previously reported {Barajas-Lopez, 2002 #4}). The EC₅₀ values for GABA and ACh were 104 and 324 μM, whereas the Hill coefficient values were 1.3±0.1 and 1.6±0.18, respectively. The current amplitude induced by maximal concentrations of GABA (0.3 mM) and ACh (1 mM) was variable in different cells but a typical value was between 0.18-7.4 nA (range from only few pA up to -7.4 nA). However, currents were included in the analysis when their amplitude was at least 100 pA. In these cells, the mean peak-amplitude of I_{GABA} and I_{ACh} - 2.46±0.54 (n=232 out of 333) and - 0.79±0.11 nA (n=235 out of 333), respectively. A larger variability was noticed in the amplitude of I_{GABA} than in I_{ACh} . The amplitude of these currents was independent of each other and, in fact, some cells only generated I_{GABA} (62 out of 333) or I_{ACh} (65 out of 333 neurons), indicating that these channels are expressed independently in myenteric neurons.

I_{ACh} and I_{GABA} onsets were virtually the same. Thus the time required to reach the half-maximal current was not

Interactions between GABA_A and nACh channels
(en preparación)

significantly different in six analyzed cells. This time had mean values of 28.68 ± 9.68 and 34.02 ± 16.18 ms for I_{GABA} and I_{ACh} , respectively. These currents usually reached their peak within the following second. After reaching their maximal amplitude the currents decreased despite the continuous presence of the transmitters (current inactivation), indicating receptor tachyphylaxis. Desensitization of GABA_A receptors was slower than the one observed for nACh receptors. In six analyzed cells treated with long-term (90 s) applications of GABA, receptor desensitization was better fitted by the sum of two exponential functions (τ values of these functions are given below). In the same six neurons treated with long-term (90 s) applications of ACh, current desensitization was better fitted by the sum of two exponential functions (τ values of these functions are given below). τ_1 value of I_{GABA} was significantly different ($P < 0.05$) than τ_1 value of I_{ACh} . Meanwhile τ_2 value of I_{GABA} and τ_2 value of I_{ACh} were not different. After removing the agonists from the external solution, currents decreased until they disappeared. This decay was well fitted by a single exponential function with mean τ values of 0.83 ± 0.09 and 0.48 ± 0.06 s for I_{GABA} and I_{ACh} , respectively ($n=7$). These values were significantly different ($P < 0.005$).

Currents induced by γ -aminobutyric acid and acetylcholine were not additive

The experiments described above demonstrated that I_{GABA} and I_{ACh} have different kinetics and that they are mediated by activation of pharmacologically distinct receptors. If the two currents are mediated by functionally independent ion channels then the currents induced by concentrations of GABA and ACh of 0.3 mM and 1 mM, respectively (when receptor occupancy would be expected to be 70% to 100%) should be additive. To investigate if this is the case, we measured the peak of I_{ACh} , I_{GABA} , and the current induced by the simultaneous application of the same

concentrations of both agonists ($I_{GABA+ACh}$) in the same neuron.

It was found mathematical addition of individual currents yielded a current ($I_{ACh} + I_{GABA} = I_{Expected}$; -3.18 ± 0.51 nA), which was significantly larger ($P < 0.001$; $n=26$) than $I_{GABA+ACh}$; (-2.88 ± 0.48 nA), revealing an occlusion between I_{GABA} and I_{ACh} (Fig. 1A and 1B). In order to rule out the possibility that current occlusion was due to the whole-cell access resistance, eighty-five to ninety-five percent of this (usually 6 M Ω) was compensated in ten out of the previously described 26 neurons. In these experiments, $I_{Expected}$ (-4.06 ± 1.04 nA) was still significantly larger than $I_{GABA+ACh}$ (-3.83 ± 1.03 nA; $P < 0.01$).

Current kinetics of responses induced by simultaneous application of both agonists

Figure 2 shows the average onset of I_{GABA} , I_{ACh} , $I_{GABA+ACh}$, and $I_{Expected}$ from six analyzed neurons and demonstrates the presence of current occlusion since the beginning of their activation. This occlusion was significant ($P < 0.05$) 15 ms after the beginning of these currents. At this time, the average $I_{Expected}$ was -62.7 ± 16.03 pA and $I_{GABA+ACh}$ -16 ± 4.4 pA. In other words, current occlusion occurs rapidly and concomitantly with channel activation.

Figure 3A shows the average I_{GABA} , I_{ACh} , $I_{GABA+ACh}$ from six neurons exposed to long application (90 s) of the neurotransmitters. Visual inspection of these recordings revealed that $I_{GABA+ACh}$ desensitized faster than I_{GABA} but slower than I_{ACh} . To quantify this, exponential fits were performed using the data of the desensitization phase (inactivation). Desensitization of $I_{GABA+ACh}$ was better fitted by the sum of two exponential functions, as well I_{GABA} and I_{ACh} . τ values of the first (τ_1) exponential of $I_{GABA+ACh}$ and τ_1 of I_{ACh} were significantly different ($P < 0.05$) (Fig 3B).

After washing out the agonists from the external solution, $I_{GABA+ACh}$ decay appears to be different from that of either

Interactions between GABA_A and nACh channels
(en preparación)

I_{ACh} (Fig 4A and 4B). Indeed, the decay of $I_{GABA+ACh}$ was well fitted by one exponential function ($n=7$). Average τ value of this exponential (τ) was virtually the same to τ of I_{GABA} decay and the average τ value of the exponential (τ) of $I_{GABA+ACh}$ is different from τ of I_{ACh} decay (Fig 4B). These observations indicate that $I_{GABA+ACh}$ is mediated by the opening of both nACh and GABA_A channels.

Pre-receptor mechanisms and technical artefacts as the origin for the current occlusion

The following experiments rule out that current occlusion is due to prereceptor mechanism. In seven analyzed cells with very low response or no initial response to ACh (-25.4 ± 16.5 pA; Fig. 5A), $I_{GABA+ACh}$ (-2444.7 ± 325.7 pA) had the same amplitude and similar kinetics as I_{GABA} alone (2709.1 ± 558.4 pA). Similarly, in another six cells, in which I_{GABA} with not initial response to GABA (0.0 pA; Fig 5C), $I_{GABA+ACh}$ (-2554.8 ± 648.2 pA) had the same amplitude and similar kinetics as I_{ACh} alone (-2586.7 ± 605.5 pA). Similarly, in another seven cells, in which I_{ACh} (-21.29 ± 13.8 pA) had been previously blocked with hexametonium 1 mM (Fig. 5B), $I_{GABA+ACh}$ (-1318.7 ± 458.3 pA) had the same amplitude as I_{GABA} (-1299.3 ± 450.4 pA). However, we did not find a specific antagonist of GABA since picrotoxin (1mM; $n=5$) and bicuculline (30 μ M; $n=3$) affected current induced by ACh between 61 and 84%, respectively {Demuro, 2001 #87; Erkkila, 2004 #86}.

Several observations rule out the possibility that current occlusion was due to a technical artefact of our recording system. However, our amplifier is capable of recording large and fast ionic currents in the same neurons and under exactly the same recording condition. Thus we were able to record voltage-activated Ca²⁺ and Na⁺ inward currents as large as -9000 pA and that, in various cases, were larger than $I_{expected}$ at -60mV (pA). It is also important to stress that the onset of voltage-activated Ca²⁺ and Na⁺ currents is faster (a

few milliseconds) than that of I_{GABA} and I_{ACh} (hundred of milliseconds).

Simultaneous application of both agonists desensitized GABA_A and nACh receptors

In the following experiments, we measured the amplitude of both I_{GABA} and I_{ACh} before (5min) and immediately after (~5 s) a long application of ACh+GABA. This long application lasted until the peak current had decreased more than 80% of its initial amplitude (usually within 90 seconds). Some typical recordings and the average data from such experiments are shown in Figs 6A-D. We observed that application of ACh+GABA decreased both I_{ACh} (Fig 6A) and I_{GABA} (Fig 6B) to less than 20% of their control amplitude (Fig 6E). Such an inhibition was not due to cross-desensitization because nACh receptor desensitization did not affect I_{GABA} (Fig 6C) and GABA_A receptor desensitization alone did not affect I_{ACh} (Fig 6D). These observations, coupled with the fact that $I_{GABA+ACh}$ kinetics is different from the kinetics of I_{GABA} or I_{ACh} alone (Fig 2-4), indicate that $I_{GABA+ACh}$ is carried through both GABA_A and nACh channels. This would also imply that current occlusion is mediated by partial inhibition of both channels.

Role of protein phosphorylation, and intracellular Ca²⁺ in current occlusion

ACh and GABA are also known to activate metabotropic receptors (mACh and GABA_B) in enteric neurons {Cherubini, 1984 #38; Cherubini, 1985 #37; Krantis, 2000 #24}. Activation of these receptors would lead to activation of G-proteins, changes in second messengers, activation of protein kinases, and protein phosphorylation. Therefore, one possibility is that at least part of the current occlusion observed here could be mediated by activation of metabotropic receptors.

Current occlusion was still observed after inhibiting protein phosphorylation (Fig 7) by either lowering the temperature to 10°C or adding a non-

Interactions between GABA_A and nACh channels
(en preparación)

specific protein kinase inhibitor (5 μ M staurosporine) to the internal solution {Ruegg, 1989 #31}.

Nicotinic receptors are permeable to Ca²⁺, which suggests that current occlusion is mediated by a raise in the intracellular concentration of this ion. Against this hypothesis, however, the current occlusion was still observed in total absence of Ca²⁺ in the extracellular and intracellular medium (Fig 7). These experiments were carried out with the standard intracellular and extracellular solutions but the latter containing no Ca²⁺ plus 50 μ M EGTA.

Discussion

This is the first demonstration in guinea pig in myenteric neurons that activation of GABA_A and nACh receptors is not independent and ionic currents carried through them are occluded when they are simultaneously activated. This current occlusion is observed as soon as currents are activated, and does not require Ca²⁺ or protein phosphorylation. Altogether, these observations suggest that this current occlusion is mediated by cross-inhibition and by a direct interaction between GABA_A and nACh channels. Similar interactions to the ones proposed here have been shown between nACh and P2X receptors {Barajas-Lopez, 1998 #7; Khakh, 2000 #41; Zhou, 1998 #22}, between GABA_A and P2X receptors ({Sokolova, 2001 #26; Karanjia, 2006 #1}) and GABA_A and 5-HT₃ (Miranda-Morales, 2007**). Interactions of metabotropic receptors have also been reported between dopamine (D2) and somatostatin (SSTR5) receptors ({Rocheville, 2000 #48}), and between dopamine (D5) and GABA_A channels ({Liu, 2000 #58}). This is one of the first studies that demonstrate interactions between two members of the *Cys-loop* family, which would suggest the existence of inhibitory interactions between the same populations of ligand-gated channels (e.g. GABA_A).

Zhou and Galligan (1998) have reported the lack of occlusion between I_{GABA} and I_{ATP} in myenteric neurons from the whole small intestine. We found these currents to be occlusive in myenteric neurons from jejunum and ileum. One explanation for such contradictory findings is that different subtypes of receptors might be expressed in their neuronal cultures because they recorded neurons up to 2 weeks after planting from newborn guinea pigs, whereas we used neuronal cultures up to 80 h after planting from young animals.

These interactions between receptor proteins play a major role in neuronal signalling in many if not all synapses. This hypothesis, however, requires further experimental analysis and it is clearly out of the scope of the present study.

Cross-inhibition between GABA_A and nACh channels is mediated by a direct interaction between these receptors

Enteric neurons also express metabotropic GABA and ACh receptors ({Cherubini, 1984 #38; Cherubini, 1985 #37; Zhou, 2000 #20}), which are known to be linked to, second messengers and protein phosphorylation cascades ({Krantis, 2000 #24}). Several of our observations, however, indicate that activation of these receptors is not required for the current occlusion observed here. First, current occlusion occurs, as soon as GABA_A and nACh channels are activated, indicating that this occlusion is as fast as the activation of these ligand-gated channels. Second, inhibition of protein phosphorylation (with staurosporine or by lowering experimental temperature to 10°C) did not prevent the occlusion observed between I_{GABA} and I_{ACh}.

Currents induced by simultaneous application of both agonists are carried through both GABA_A and nACh channels

At least three different observations indicate that I_{GABA+ACh} is carried through both GABA_A and nACh channels. 1)

Interactions between GABA_A and nACh channels
(en preparación)

$I_{GABA+ACh}$ desensitizes faster than I_{GABA} but slower than I_{ACh} . 2) The decay of $I_{GABA+ACh}$ resembles the decay of I_{GABA} . 3) When GABA and ACh are applied simultaneously, both GABA_A and nACh receptors are desensitized, whereas no cross-desensitization is observed when GABA_A and nACh receptors are desensitized individually. Altogether, these observations also imply that inhibition between these channels is reciprocal.

Functional implications for these channel interactions

The present and previous experimental information suggests that inhibitory interactions between ligand-gated channels might be a widely used mechanism to limit the ionic currents through the cellular membrane. Thus functional interaction such as one demonstrated here has been shown to exist between P2X and nicotinic channels in enteric neurons ({Barajas-Lopez, 1998 #7; Zhou, 1998 #22}) and between P2X and other ligand-gated channels (GABA_A) in enteric ({Karanjia, 2006 #1}), and dorsal root ganglion neurons ({Sokolova, 2001 #26}). Finally, the present study and that of Li *et al.* ({Li, 2003 #42}), and Miranda-Morales *et al.*, show that two structurally related members ({Ortells, 1995 #45}) can interact indicating that the same type of channel (e.g. GABA_A) might also maintain cross-interactions between themselves and implying that this type of interactions might play an essential role in synaptic integration.

In conclusion, our results indicate that there is a very fast inhibitory interaction between GABA_A and nACh channels. These interactions occur as fast as the activation of GABA_A and nACh, supporting the hypothesis that these receptors are located very closed to each other in the neuronal membrane, perhaps forming functional units constituted by at least one channel of each type. Since these channels are structurally similar, it might be possible that these interactions are present between the same channels of the

same type (e.g. nACh) implying an important role in neuronal signalling.

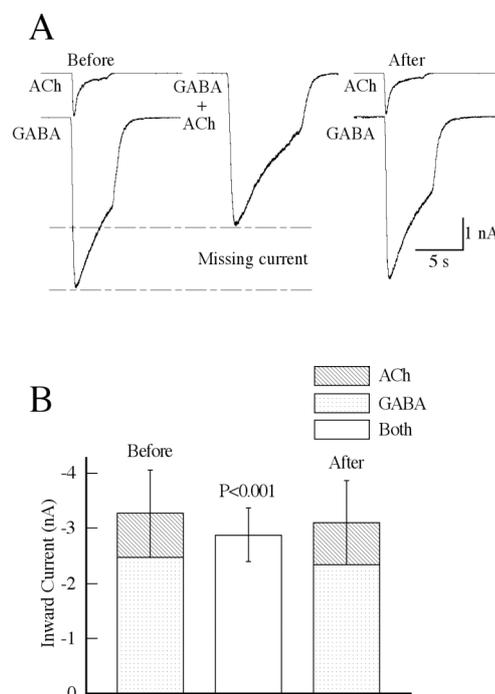


Figure 1. Whole-cell inward currents induced by GABA (I_{GABA}) and ACh (I_{ACh}) are not additive, revealing a current occlusion. A: shows recordings from one neuron of a typical experiment and **B:** the average (bars) values of twenty-six experiments. Currents were induced by application of either GABA (0.3 mM) or ACh (1 mM) and by the simultaneous application of both agonists ($I_{GABA+ACh}$). I_{GABA} and I_{ACh} were recorded five min before and five min after $I_{GABA+ACh}$. **B:** the first and third bars show the mean values of I_{GABA} and I_{ACh} , the addition of these currents represents expected current ($I_{Expected} = I_{GABA} + I_{ACh}$). S.E.M. are shown as lines in the top of the bars for $I_{Expected}$ and $I_{GABA+ACh}$. The latter current is significantly lower than $I_{Expected}$.

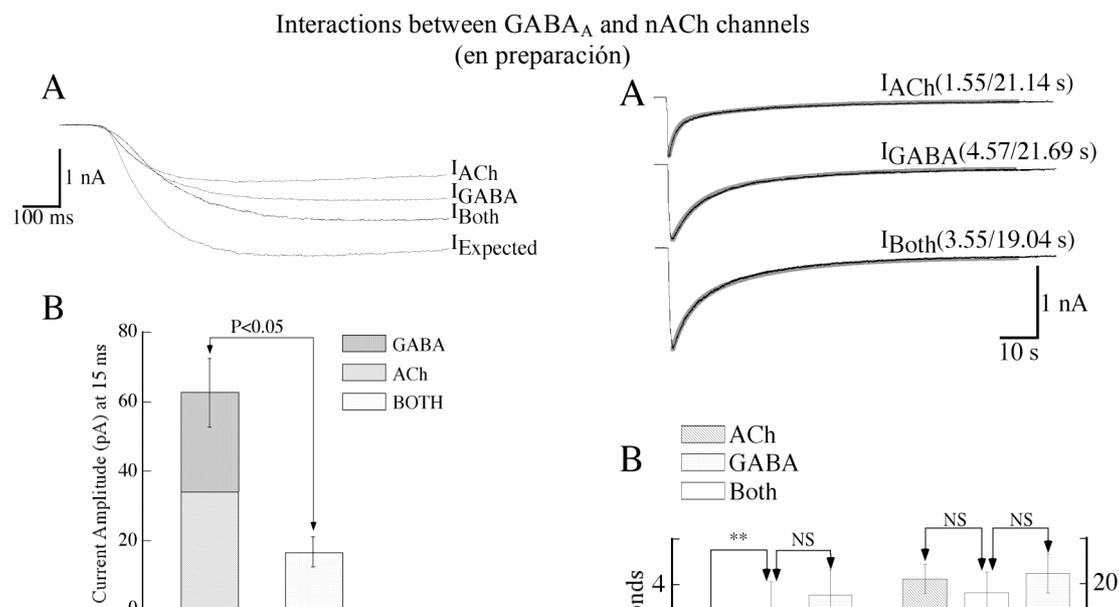


Figure 2. Onset of these currents indicates that occlusion is fast and bidirectional. **A:** Current occlusion is observed as soon as activation of the currents. All current tracings are mean currents from a total of six analysed myenteric neurons. The current induced by simultaneous application of both agonists ($I_{GABA+ACh}$) is smaller than the expected current ($I_{Expected} = I_{GABA} + I_{ACh}$) as soon as currents are detected. Moreover, this difference is significant ($P < 0.05$). Whole-cell currents were measured at a holding potential of -60 mV. Only the initial portion of the currents (~ 1 s) is depicted. **B:** First bar shows $I_{GABA} + I_{ACh}$ and the second bar show the addition of these currents represents expected current ($I_{Expected} = I_{GABA} + I_{ACh}$). S.E.M. are shown as lines in the top of the bars for $I_{Expected}$ and $I_{GABA+ACh}$.

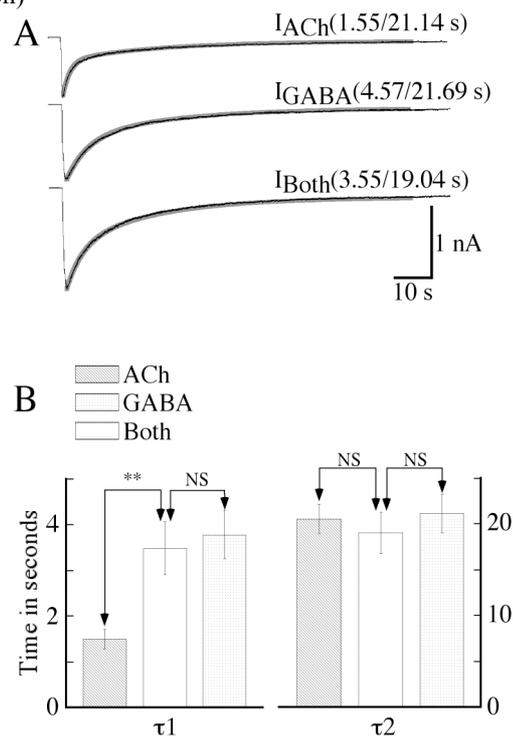


Figure 3. Desensitization kinetics of $I_{GABA+ACh}$ cannot be explained by the desensitization kinetics of I_{GABA} or I_{ACh} alone. **A:** representative recordings from a myenteric neuron of I_{GABA} , I_{ACh} and $I_{GABA+ACh}$. The desensitization of I_{GABA} , I_{ACh} and $I_{GABA+ACh}$ was best fitted by the sum of two exponential functions (thick gray lines). **B:** bars in the lower graphs represent the mean and S.E.M. of the τ values of these exponential functions. The τ_1 value of I_{ACh} exponentials were significantly (**, $P < 0.05$) smaller than the correspondent τ values of $I_{GABA+ACh}$. The τ values of the two exponentials of I_{GABA} were not different (NS, not significant) than the correspondent τ values of $I_{GABA+ACh}$ exponentials. Exponential fits were performed using the data from current peak to the “steady state” component. In the experiments, the agonist was applied for approximately 90 seconds, and the holding potential was -60 mV.

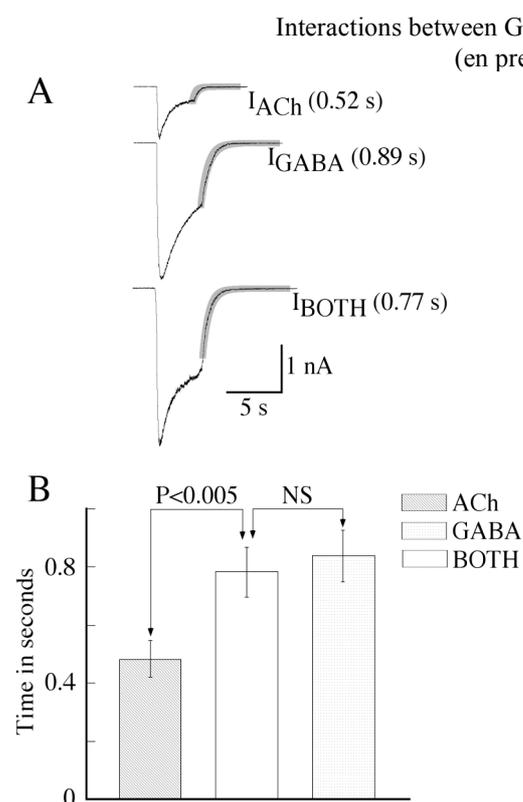


Figure 4. Decay kinetics analysis of these currents indicates that occlusion is bidirectional. **A:** $I_{GABA}+I_{ACh}$ appear to be mediated by the opening of both channels, nACh and GABA_A. Current induced by GABA (I_{GABA}), ACh (I_{ACh}) and both agonist ($I_{GABA}+I_{ACh}$), are representative recordings from one myenteric neuron. Decay of I_{GABA} , I_{ACh} and $I_{GABA}+I_{ACh}$ were best fitted by single exponential function (thick grey line). Between brackets are the τ of these exponential functions in seconds. **C:** bars in these graphs represent the mean \pm S.E.M. values ($n = 7$) of the τ of these exponential functions. The τ_1 of I_{GABA} was not significantly (**NS**) different from τ_1 of $I_{GABA}+I_{ACh}$. The τ_1 of I_{ACh} was significantly different from τ_1 of $I_{GABA}+I_{ACh}$. Exponential fits were performed using the data from a couple hundred milliseconds after removing the agonists to the "steady-state" component. In these experiments the holding potential was -60 mV.

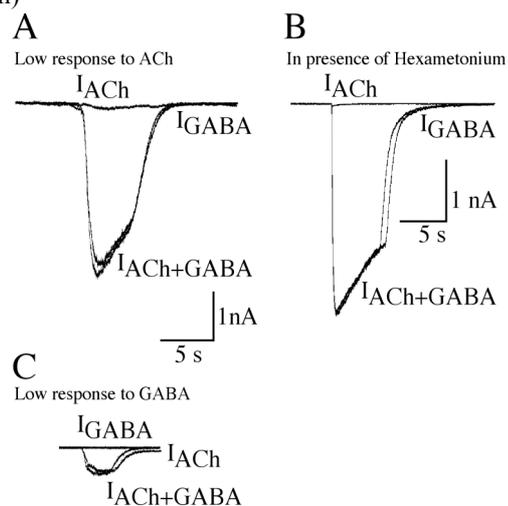


Figure 5. Inhibitory interactions between GABA and ACh receptors required the presence of functional channels. **A:** recording from a neuron in which ACh induced only a small initial current (I_{ACh}), indicating few functional nACh receptors in this cell, but with a prominent response to I_{GABA} . Note that ACh did not modify either the amplitude or the kinetics of the I_{GABA} . **B:** similar results were obtained when I_{ACh} was blocked with a nACh receptors antagonist (1 mM of hexametonium). **A** and **B** were measured from two different myenteric neurons, at a holding potential of -60 mV. **C:** recording from a neuron in which GABA induced only a small initial current (I_{GABA}), indicating few functional GABA_A receptors in this cell, but with a prominent response to I_{ACh} . Note that GABA did not modify either the amplitude or the kinetics of the I_{ACh} . However, antagonists of GABA (bicuculline; 30 μ M and picrotoxin; 1 mM) also affected I_{ACh} between 85 and 61%, respectively).

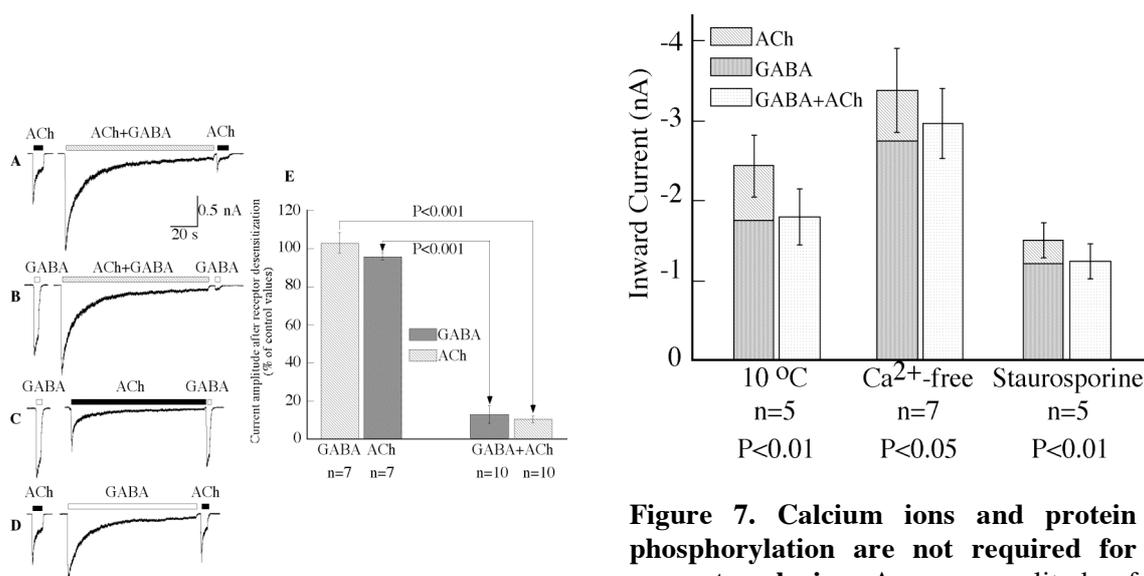
Interactions between GABA_A and nACh channels
(en preparación)

Figure 6. Simultaneous application of GABA and ACh induced desensitisation of both GABA_A and nACh receptors, which was not due to cross desensitisation between these receptors. Control I_{ACh} (A and D) and I_{GABA} (B and C) was recorded five minutes before (left recordings) and immediately after (~5 s), the prolonged application of both agonists (A and B), ACh (C) or GABA (D). E: average amplitude of I_{GABA} and I_{ACh} recorded after the prolonged application of ACh, GABA or GABA+ACh, as a percentage of control response (n=10 or n=7). Line on top of the bars represents S.E.M. Recordings are from two neurons taken at the holding potential of -60 mV.

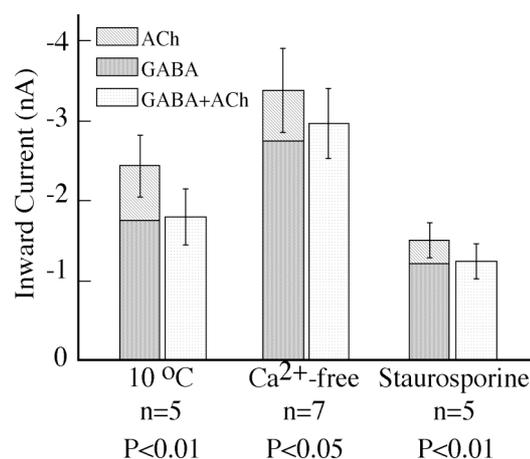


Figure 7. Calcium ions and protein phosphorylation are not required for current occlusion. Average amplitude of inward currents induced by application of GABA (I_{GABA}), ACh (I_{ACh}) or GABA+ACh ($I_{GABA+ACh}$) in three different experimental groups of myenteric neurons. A pair of bars represents data for each group. The first bar of each pair is a combined bar and shows the average I_{ACh} and I_{GABA} before application of GABA+ACh. This combined bar, therefore, represents the average expected current ($I_{Expected} = I_{GABA} + I_{ACh}$). The second bar represents the mean $I_{GABA+ACh}$. Error lines on the top of the bars are S.E.M. for $I_{Expected}$ and $I_{GABA+ACh}$. Five experiments were performed by cooling down the external solution to 10°C. Ca²⁺-free experiments were carried out in 0-Ca²⁺ plus 50 μ M EGTA extracellular media and with the standard intracellular solution (n=7). The protein kinase (PK) inhibitors experiments were carried out using standard intracellular solution plus Staurosporine (5 μ M), n=5. All these experiments were carried out at a holding potential of -60 mV.