

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Selectividad de Antagonistas para Receptores
Nativos *Cys-loop* de ACh, 5-HT y GABA en
Neuronas Mientéricas del Cobayo**

Tesis que presenta

Esri Hazael Juárez

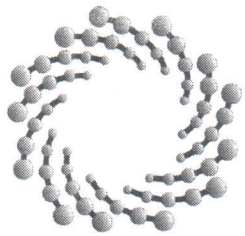
Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis:

Dr. Carlos Barajas López

San Luis Potosí, S.L.P., 30 de Agosto, 2013



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Selectividad de Antagonistas para Receptores Nativos Cys-loop de ACh, 5-HT y GABA en Neuronas Mientéricas del Cobayo**" presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Esri Hazael Juárez** y aprobada el **treinta de agosto del dos mil trece** 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.

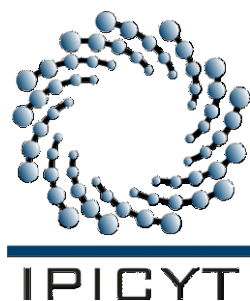
Dr. Carlos Barajas López
Director de la tesis

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Marcial Bonilla Marín
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Luis Manuel Montano Ramírez
Miembro del Comité Tutorial

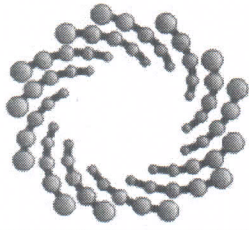
Dr. Sergio Zarazúa Guzmán
Miembro del Comité Tutorial



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 Doctor Carlos Barajas López.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Num. 204156 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

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

Acta de Examen de Grado

Fotografía

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 058 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 30 días del mes de agosto del año 2013, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Marcial Bonilla Marín	Secretario	IPICYT
Dr. Carlos Barajas López	Sinodal	IPICYT
Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez	Sinodal externo	UNAM
Dr. Sergio Zarazúa Guzmán	Sinodal externo	UASLP

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

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Esri Hazael Juárez

sobre la Tesis intitulada:

Selectividad de Antagonistas para Receptores Nativos Cys-loop de ACh, 5-HT y GABA en Neuronas Mientéricas del Cobayo

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Carlos Barajas López

El Jurado, después de deliberar, determinó

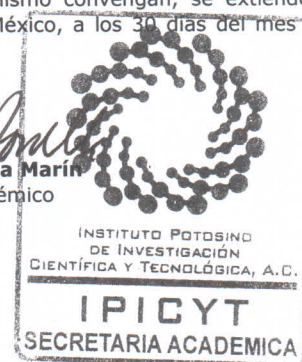
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 18:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 30 días del mes de agosto de 2013.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

**Para Gabriela Vázquez Rodríguez, el faro que me guía a
puerto seguro en medio de mi tempestad.**

Agradecimientos

Agradezco al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., por el permitirme realizar el doctorado en sus instalaciones, también agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la proporción de una beca (Num. 204156). Así mismo, agradezco a la Enfermera Rosa Espinosa Luna, Técnico del Laboratorio de Neurobiología de la División de Biología Molecular, por su ayuda y apoyo a cualquier problema.

Por otro lado, agradezco a la Dra. Marcela Miranda Morales por su ayuda, guía y compañerismo durante su estadía en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Es importante mencionar que gracias al Sindicato Nacional de Trabajadores de la Educación Sección 28 pude tramitar el permiso sindical, sin goce de sueldo, ante la Secretaría de Educación del Estado de Sonora para estudiar mi posgrado.

Adicionalmente, quiero agradecer a los diferentes miembros del Laboratorio de Neurobiología.

También agradezco la guía del Dr. Marcial Bonilla Marín a lo largo de mi estancia en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., y por su co-dirección en mi doctorado. Las enseñanzas del Dr. Marcial Bonilla Marín me marcaron el camino a seguir en la vida.

De manera especial y profunda, agradezco al Dr. Carlos Barajas López por darme la oportunidad de estudiar el doctorado bajo su tutela, además agradezco su constante consejo, guía, ayuda, eterna paciencia y amistad, sin él jamás tendría el grado de Doctor en Ciencias. Sin temor a equivocarme, la presencia del Dr. Carlos Barajas López ha definido mi vida, el Dr. Carlos Barajas López me ayudó a establecer metas y objetivos en la vida, siempre siguiendo los más altos estándares laborales, morales y éticos.

Contenido

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	i
Créditos institucionales	ii
Acta de examen	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de anexos	x
Abreviaturas	xi
Glosario	xii
Resumen	xiv
Abstract	xv
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 TRANSMISIÓN SINÁPTICA	1
1.1.1 Transmisión sináptica eléctrica	1
1.1.2 Transmisión sináptica química	2
1.1.2.1 Receptores metabotrópicos y la transmisión sináptica lenta	3
1.1.2.2 Receptores ionotrópicos y la transmisión sináptica rápida	4
1.2 ESTRUCTURA DE LOS CANALES ACTIVADOS POR LIGANDO (LGIC)	6
1.2.1 Dominio extracelular	8
1.2.2 Dominio transmembranal	9
1.2.3 Dominio intracelular	10
1.3 SUPERFAMILIA DE RECEPTORES P2X	11
1.3.1 Dominio extracelular	11
1.3.2 Dominio transmembranal	13
1.3.3 Dominio intracelular	14
1.4 SUPERFAMILIA DE RECEPTORES CYS-LOOP	14
1.4.1 Dominio extracelular	15
1.4.2 Dominio transmembranal	17
1.4.3 Dominio intracelular	17
1.5 IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE LOS RECEPTORES CYS-LOOP Y P2X EN EL SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO	18
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	21
OBJETIVO GENERAL	22
Objetivos particulares	22
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1 Disección del plexo mientérico de cobayo	23

2.2 Cultivo neuronal primario	23
2.3 Electrofisiología	24
2.4 Soluciones	24
2.5 Aplicación de las sustancias	25
2.6 Adquisición de las sustancias	26
2.7 Análisis de datos	26
CAPÍTULO 3 RESULTADOS	27
3.1 Propiedades generales de las corrientes de célula completa por receptores <i>Cys-loop</i> en neuronas mientéricas	27
3.2 Efecto de diferentes antagonistas sobre los receptores <i>Cys-loop</i> presentes en neuronas mientéricas	28
3.2.1 El hexametonio inhibió específicamente los receptores nACh	28
3.2.2 La bicuculina y la picrotoxina inhibieron los tres receptores <i>Cys-loop</i> de las neuronas mientéricas	28
3.2.3 El ondansetrón inhibió específicamente a los receptores 5-HT ₃ y nACh	29
CAPÍTULO 4 DISCUSIÓN	38
4.1 Conclusiones	40
AGRADECIMIENTOS	41
CAPÍTULO 5	42
REFERENCIAS	
CAPÍTULO 6	54
ANEXOS	
6.1 Efecto de la melatonina sobre receptores ionotrópicos nativos de neuronas mientéricas de cobayo	54
6.2 <i>Selectivity of antagonists for the Cys-loop Native Receptors for ACh, 5-HT and GABA in Guinea-Pig Myenteric Neurons</i>	59

Lista de tablas

Tabla 1. IC ₅₀ (en μM) de diferentes antagonistas de los receptores Cys-loop	37
--	----

Lista de Figuras

Figura 1 Esquema de la transmisión sináptica rápida	5
Figura 2 Diagrama de listón de un receptor nicotínico neuromuscular	7
Figura 3 Diagrama de listones de la subunidad P2X ₄ del pez cebra basada en su estructura cristalográfica	12
Figura 4 Diagrama de listones del sitio de unión al ligando en el dominio extracelular de un receptor <i>Cys-loop</i>	16
Figura 5 Representación esquemática mostrando la localización del plexo mientérico en el intestino	19
Figura 6 Curva concentración respuesta de los agonistas de los receptores <i>Cys-loop</i> presentes en neuronas mientéricas	30
Figura 7 Receptores nACh, 5-HT ₃ y GABA _A son expresados independientemente uno de los otros	31
Figura 8 Activación de los receptores nACh, 5-HT ₃ y GABA _A desensibiliza a su propio receptor	32
Figura 9 El hexametonio (HEX) inhibió específicamente a los receptores nicotínicos dependiendo de la concentración	33
Figura 10 La bicuculina inhibe a los receptores GABA _A , nicotínicos y 5-HT ₃	34
Figura 11 La picrotoxina inhibe a los receptores GABA _A , nicotínicos y 5-HT ₃ .	35
Figura 12 El ondansetron inhibe las corrientes inducidas por 5-HT y ACh pero no las corrientes inducidas por GABA	36

Lista de Anexos

CAPITULO 6	54
ANEXOS	
ANEXO 1	54
<i>6.1 Efecto de la melatonina sobre receptores ionotrópicos nativos de neuronas mientéricas de cobayo</i>	54
ANEXO 2	
<i>6.2 Selectivity of antagonists for the Cys-loop Native Receptors for ACh, 5-HT and GABA in Guinea-Pig Myenteric Neurons</i>	59

Abreviaturas

5-HT₃	receptor a la 5-hidroxitriptamina tipo tres
ACh	acetilcolina
Arg	arginina
Asp	asparagina
ATP	5'-trifosfato de adenosina
Cys	cisteína
GABA	ácido γ -aminobutírico
GABA_A	receptor al ácido γ -aminobutírico
Lys	lisina
nACh	receptor nicotínico activado por la acetilcolina
Phe	fenilalanina
PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C
Ser	serina
Thr	treonina
Tyr	tirosina
X	cualquier aminoácido
cAMP	Monofosfato de la adenosina cíclico

Glosario

Antagonista: sustancia que al unirse a un receptor no induce una respuesta biológica e impide que el agonista se una al receptor.

Bicuculina: clásico antagonista competitivo de los receptores GABA_A. Se extrae de diferentes plantas como *Dicentra cucullaria* y *Adlumia fungosa*.

EC₅₀: es la concentración de agonista que induce el 50% del efecto máximo observado.

Hexametonio: clásico antagonista no competitivo de los receptores nACh.

Homología: similitud en la secuencia de aminoácidos que comparten dos o más proteínas.

IC₅₀: es la concentración de antagonista que induce el 50% de la inhibición máxima observada.

Melatonina: hormona liberada por la glándula pineal y en el tracto gastrointestinal. Involucrada en la modulación del ciclo circadiano.

Ondansetrón: clásico antagonista competitivo de los receptores 5-HT₃.

Patch clamp: técnica electrofisiológica en que una pipeta se fija a una sección de la membrana y permite el estudio de canales iónicos.

Picrotoxina: clásico antagonista no competitivo de los receptores GABA_A. Se extrae de la planta *Anamirta cocculus*.

PKA: enzima que se activa cuando aumenta el AMP cíclico y cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP a una proteína en los aminoácidos serina o treonina.

PKC: enzima activada por el diacilglicerol o Ca^{2+} y transfiere un grupo fosfato del ATP a una proteína en los residuos serina o treonina.

Proteína alostérica: proteína que al unir una molécula blanco sufre un cambio conformacional el cual modifica la afinidad por otra u otras moléculas blanco.

Resumen

Selectividad de Antagonistas para los Receptores *Cys-loop* Nativos para ACh, 5-HT y GABA en Neuronas Mientéricas del Cobayo

Los tres canales activados por ligando más comunes expresados por neuronas mientéricas son nACh, 5-HT₃ y GABA_A. Para investigar las funciones de estas proteínas se han usado inhibidores como el hexametonio (antagonista de los receptores nACh), ondansetrón (antagonista de los receptores 5-HT₃), picrotoxina y bicuculina (ambos antagonistas de los receptores GABA_A). El objetivo del presente trabajo fue investigar la especificidad de estos inhibidores sobre los receptores *Cys-loop* nativos de neuronas mientéricas del intestino delgado del cobayo. La configuración de célula completa de la técnica *patch clamp* fue usada para registrar las corrientes de membrana inducidas por ACh (I_{ACh}), 5-HT (I_{5-HT}) y GABA (I_{GABA}) en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de hexametonio, ondansetrón, picrotoxina o bicuculina. Los tres receptores *Cys-loop* presentes en neuronas entéricas son expresados independientemente y no hay desensibilización cruzada. El hexametonio inhibió las I_{ACh} sin afectar las I_{5-HT} y las I_{GABA} . El ondansetrón inhibió la I_{5-HT} y la I_{ACh} pero no afectó la I_{GABA} . La picrotoxina y la bicuculina inhibieron la I_{5-HT} , la I_{ACh} y la I_{GABA} con diferente potencia, siendo menos potentes sobre los receptores 5-HT₃. Todos los efectos inhibitorios fueron dependientes de la concentración y reversibles. Nuestras observaciones mostraron que excepto por el hexametonio, el resto de los inhibidores estudiados aquí mostraron grados de selectividad, la cual tiene que ser considerada cuando estos antagonistas son usados en estudios experimentales dirigidos a investigar las funciones de estos receptores; en particular, en tejidos que expresan receptores nACh porque estos receptores son blancos de todos los inhibidores aquí estudiados. La baja potencia de la picrotoxina y la bicuculina para inhibir los receptores 5-HT₃ sugiere que estos receptores están formados por proteínas heteroméricas.

PALABRAS CLAVE: *Picrotoxina, bicuculina, hexametonio, ondansetrón, sistema nervioso entérico, canales activados por ligando.*

Abstract

Selectivity of antagonists for the *Cys-loop* Native Receptors for ACh, 5-HT and GABA in Guinea-Pig Myenteric Neurons

The three most common *Cys-loop* receptors expressed by myenteric neurons are nACh, 5-HT₃, and GABA_A. To investigate the function of these proteins researchers have used channel inhibitors such as hexamethonium (antagonist of nACh receptors), ondansetron (antagonist of 5-HT₃ receptors), picrotoxin, and bicuculline (both antagonists of GABA_A receptors). The aim of the present study was to investigate the specificity of these inhibitors on *Cys-loop* receptors of primary cultured neurons obtained from the guinea-pig small intestine. The whole cell configuration of the patch clamp techniques was used to record membrane currents induced by ACh (I_{ACh}), 5-HT (I_{5-HT}) and GABA (I_{GABA}) in the absence and the presence of various concentrations of hexamethonium, ondansetron, picrotoxin, or bicuculline. The three *Cys-loop* receptors present in enteric neurons are expressed independently and they are not cross-desensitized. Hexamethonium inhibited I_{ACh} without affecting I_{5-HT} and I_{GABA} . Ondansetron inhibited I_{5-HT} and also I_{ACh} but did not affect I_{GABA} . Picrotoxin and bicuculline inhibited I_{5-HT} , I_{ACh} and I_{GABA} with different potency, the lowest potency being on 5-HT₃ receptors. All these inhibitory effects were concentration dependent and reversible. Our observations showed that except for hexamethonium, all other inhibitors used here show different degrees of selectivity, which has to be considered when their antagonists are used in experimental studies aimed to investigate the functions of these receptors. In particular, in tissues expressing nACh receptors because these are the targets of all other inhibitors used here. The low potency of picrotoxin and bicuculline to inhibit 5-HT₃ receptors suggest that these are formed by heteromeric proteins.

KEY WORDS: *Picrotoxin, hexamethonium, bicuculline, ondansetron, enteric nervous system, ligand-gated ion channels*

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 TRANSMISIÓN SINÁPTICA

La transmisión sináptica es el proceso mediante el cual se lleva a cabo la transferencia de información entre dos neuronas o bien entre una neurona y otro tipo de célula, p.e. con células del músculo esquelético. Clásicamente, la sinapsis consiste en un elemento presináptico y otro postsináptico.

Se pueden distinguir dos tipos de transmisión sináptica, la eléctrica y la química (Kandel et al., 2000; Levitan et al., 2001).

1.1.1 Transmisión sináptica eléctrica

Brevemente, en este tipo de transmisión sináptica la membrana presináptica y la postsináptica comparten comunicaciones intercelulares llamadas uniones comunicantes. Estas uniones son canales protéicos de muy alta conductancia eléctrica que dejan pasar sustancias hasta de 900 Daltons. La baja resistencia eléctrica de estos canales permite la transmisión del potencial de acción de la neurona presináptica hacia la célula postsináptica. Estos canales permiten que muchas moléculas "pequeñas" fluyan entre los citoplasmas de las células pre- y post-sinápticas. Este tipo de transmisión sináptica es rápida y sufre un mínimo de retardo. Como es de esperarse este tipo de sinápsis sólo permite la transmisión de señales excitatorias (Kandel et al., 2000; Levitan et al., 2001).

1.1.2 Transmisión sináptica química

En esta variedad de transmisión, las membranas pre- y post-sinápticas están separadas por un espacio de 20 a 40 nm denominado hendidura sináptica. La transmisión de la información del elemento presináptico al postsináptico se realiza mediante la liberación de sustancias llamadas neurotransmisores. Estas sustancias son liberadas a la hendidura sináptica cuando un potencial de acción invade la membrana presináptica, mediante un proceso llamado exocitosis. Los neurotransmisores se difunden en la hendidura sináptica y se unen a receptores específicos localizados en la membrana postsináptica. El efecto de la unión neurotransmisor-receptor sobre la excitabilidad de la neurona postsináptica, así como la velocidad de la respuesta, dependerá del tipo de receptor activado. Esto es, si los receptores son del tipo ionotrópico entonces la respuesta tendrá una latencia pequeña (~1 ms) y durará menos de 50 ms. Lo opuesto ocurrirá si el receptor postsináptico es del tipo metabotrópico. Igualmente, la excitabilidad se incrementará o disminuirá dependiendo de si el neurotransmisor abre o cierra canales o bien si abre canales permeables a cationes o a Cl^- . Por ejemplo, los receptores 5-HT_3 y los nACh son canales permeables a cationes y cuando se estimulan durante el potencial de membrana de reposo son de tipo excitatorio porque su activación incrementa la probabilidad de que una neurona genere potenciales de acción. Sin embargo, los receptores GABA_A son canales permeables a Cl^- y cuando se abren durante el potencial de membrana en reposo

son de tipo inhibitorio porque disminuyen la probabilidad de que potenciales de acción ocurran (Kandel et al., 2000; Levitan et al., 2001).

1.1.2.1 Receptores metabotrópicos y la transmisión sináptica lenta

Son receptores acoplados a proteínas G y su activación puede cerrar o abrir canales a través de la modulación de cascadas intracelulares de señalización. Un ejemplo de estos receptores son los adrenérgicos α_2 presentes en neuronas entéricas, los cuales son activados por la liberación de noradrenalina de fibras simpáticas. Una vez activados se activan proteínas G_i que abren canales de potasio (rectificadores internos) e inhiben la formación de cAMP. Estos receptores también activan proteínas G_o que cierran canales de calcio dependientes del voltaje. La ACh es un neurotransmisor que puede activar varios tipos de receptores muscarínicos asociados con proteínas G específicas. En las neuronas entéricas la activación de estos receptores, probablemente mediante la activación de receptores M1, produce una despolarización de la membrana, debida al cierre de canales de potasio, que ocurre concomitante al aumento en la excitabilidad neuronal. Esta despolarización es también conocida como potencial postsináptico lento colinérgico (Galligan, 1998; Kandel et al., 2000; Levitan et al., 2001).

Las proteínas G constan de tres subunidades, llamadas α , β , y γ , mientras que los receptores asociados a éstas constan de una sola subunidad con siete segmentos transmembranales (Kandel et al., 2000; Levitan et al., 2001). Cuando el neurotransmisor se une a uno de estos receptores, existe un cambio

conformacional que expone el sitio de unión a la proteína G. La interacción receptor-proteína G provoca que la proteína G se active hidrolizando el GTP a GDP. La subunidad α se disocia del resto de la proteína G (subunidades β y γ), lo que permite la unión de la subunidad α (segundo mensajero) a una proteína efectora. En algunos casos, las proteínas G regulan directamente la apertura de canales iónicos (Kandel et al., 2000; Levitan et al., 2001).

1.1.2.2 Receptores ionotrópicos y transmisión sináptica rápida

En los receptores ionotrópicos o canales activados por ligando, el sitio de unión al neurotransmisor y la función efectora (o canal) son parte de la misma molécula. Debido a esto podemos detectar la respuesta de la unión del neurotransmisor al receptor en el orden de milisegundos (Kandel et al., 2000; Levitan et al., 2001). Estos receptores son responsables de la transmisión sináptica rápida y su activación permite la generación de potenciales postsinápticos inhibitorios o excitatorios dependiendo de la permeabilidad iónica de los receptores involucrados. A estos receptores pertenecen los de la familia *Cys-loop*.

Los receptores ionotrópicos permeables a cationes muestran mayor permeabilidad para Na^+ que para K^+ y menos aún para el Ca^{2+} . Cuando se activan durante experimentos con fijación de voltaje se generan corrientes entrantes a potenciales negativos y salientes a potenciales positivos. Mostrando un potencial de inversión cerca de 0 mV, con concentraciones intracelulares y extracelulares de estos iones similares a las fisiológicas. Durante condiciones fisiológicas o durante

registros con fijación de corriente, la activación de estos receptores produce una despolarización que es dependiente de la concentración del neurotransmisor utilizado. Si la despolarización de la membrana es suficiente para alcanzar el umbral de generación de potenciales de acción, se registrará un potencial de acción que se propagará a través de la neurona postsináptica (Figura 1) (Colon-Ramos, 2009; Doyle, 2004; Lester et al., 2004; Margeta et al., 2008).

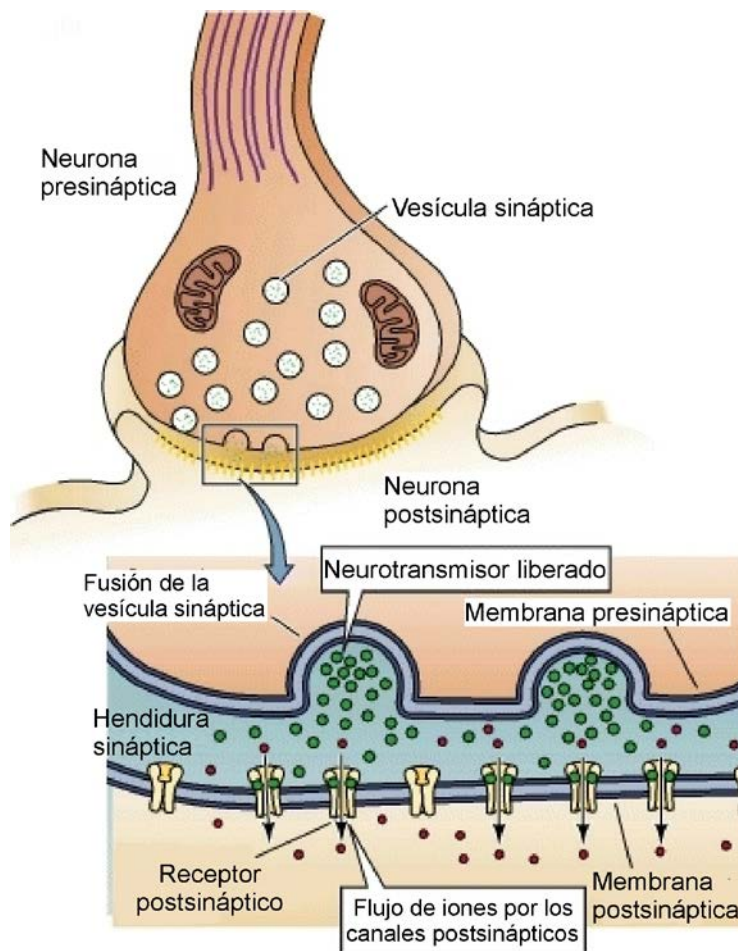


Figura 1. Esquema de la transmisión sináptica rápida. En éste tipo de transmisión, al liberarse el neurotransmisor de la terminal presináptica a la hendidura sináptica y difundir hacia la neurona postsináptica, se une a canales activados por ligando (receptores postsinápticos) y provoca el flujo de iones a través de los mismos. Imagen tomada del libro Neuroscience (Purves et al., 2001).

Los canales ionotrópicos permeables a Cl^- son activados por neurotransmisores tales como el GABA o la glicina. Cuando se activan durante experimentos con fijación de voltaje se generan corrientes salientes (el Cl^- entra a la neurona) a potenciales más negativos que el potencial de equilibrio del Cl^- . El potencial de inversión para estas corrientes es aproximadamente de -60 a -80 mV, ya que las concentraciones de Cl^- fuera de las neuronas son mayores que las concentraciones Cl^- del interior de las neuronas. A potenciales más negativos que el potencial de equilibrio las corrientes serán entrantes (Cl^- sale de la neurona) ya que el potencial vence el gradiente de concentración del Cl^- . Durante condiciones fisiológicas o durante registros con fijación de corriente, la activación de estos receptores produce una pequeña hiperpolarización que es dependiente de la concentración del neurotransmisor utilizado y del valor del potencial de membrana con respecto al potencial de inversión de las corrientes de Cl^- . Dicha hiperpolarización ocurre concomitantemente con una disminución de la resistencia de la membrana neuronal, debido a la apertura de canales. La caída en la resistencia y la hiperpolarización de la membrana neuronal disminuye la probabilidad de que se generen potenciales de acción en la neurona postsináptica por que la activación de canales permeables a Cl^- será de naturaleza inhibitoria (Barmashenko et al., 2011; Knapp et al., 1990; Letinic et al., 2002; Neunlist et al., 2001; Owens et al., 1996).

1.2 ESTRUCTURA DE LOS CANALES ACTIVADOS POR LIGANDO (LGIC)

Los LGIC más estudiados son los receptores nicotínicos activados por la acetilcolina (nACh) encontrados en la unión neuromuscular (Hille, 2001). La estructura cristalográfica del receptor nicotínico activado por la acetilcolina nos ha permitido entender los mecanismos de unión al ligando y la activación del receptor (Figura 2) (Absalom et al., 2004; Barry et al., 2005; Miyazawa et al., 2003; Unwin, 2005).

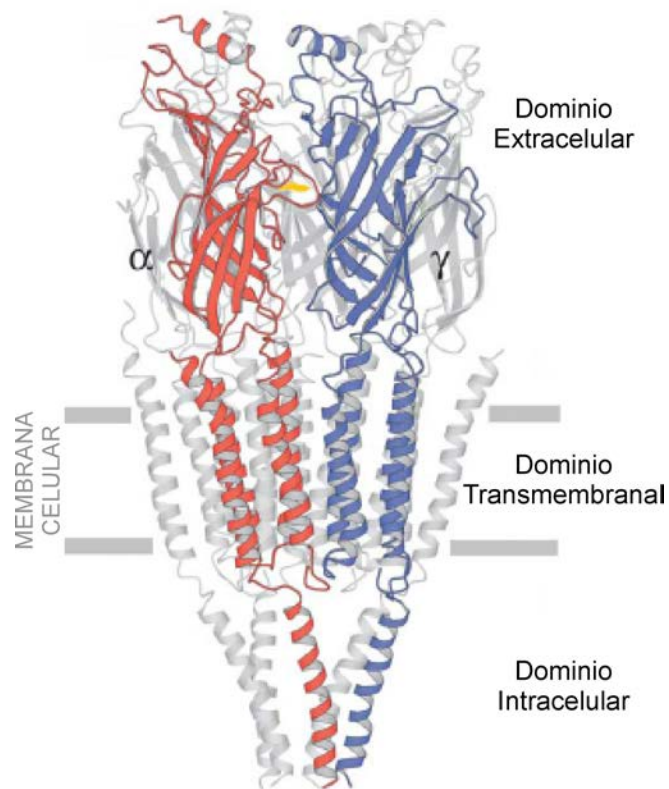


Figura 2. Diagrama de listón de un receptor nicotínico neuromuscular. En el frente se muestran las subunidades α (rojo) y γ (azul), en la subunidad α en amarillo se señala al triptófano 149, el cual está relacionado con la interacción al ligando. Imagen tomada del artículo Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution (Unwin, 2005).

Dadas las similitudes de los nAChR con el resto de los miembros de la familia *Cys-Loop*, diversos autores utilizan los nAChR como ejemplo de ésta familia. Por lo tanto, teniendo como referencia la estructura cristalográfica de los receptores nACh podemos inferir que los LGIC tienen tres dominios principales: dominio extracelular, dominio transmembranal y dominio intracelular (Absalom et al., 2004; Barry et al., 2005; Connolly et al., 2004; Tasneem et al., 2005).

1.2.1 Dominio extracelular

El dominio extracelular es donde se lleva a cabo la interacción ligando-receptor. La región de esta interacción se denomina sitio de unión al ligando o bolsa de unión al ligando, la cual se encuentra en la interface de dos subunidades. Al unirse el ligando la proteína receptora sufre un cambio conformacional que permite la formación de un canal iónico y el paso de iones a través de la membrana (Browne et al., 2010; Cederholm et al., 2009). La estructura secundaria del dominio extracelular está dada principalmente por láminas β pero también podemos encontrar hélices α y se estabiliza por puentes disulfuro, dados por interacciones cisteína-cisteína (Figura 2) (Bouzat, 2012; Browne et al., 2010).

El mecanismo por el cual el agonista interactúa con su sitio de unión al ligando aún no es bien comprendido. En los receptores de la familia *Cys-loop*, se cree que el proceso de interacción del ligando con su sitio de unión es por medio de la interacción de cationes π entre el ligando y residuos aromáticos como el triptófano y la tirosina, presentes en el sitio de unión al ligando del receptor (Mu et

al., 2003). Una vez unido el agonista a su sitio de unión actuaría como “cuña”, provocando un reacomodo de toda la estructura del receptor (Lester et al., 2004).

Sin embargo, en los receptores de la familia P2X, cuyo agonista es el ATP, el proceso de unión al ligando podría ser similar al mecanismo de “llave y cerradura” según Brown y colaboradores (Browne et al., 2010). En los receptores P2X el sitio de unión al ATP podría estar dado por ocho diferentes residuos Lys69, Lys71, Phe183 y Thr184 de una subunidad, y Asn288, Phe289, Arg290 y Lys308 de otra subunidad (Browne et al., 2010). Browne y col (2010) especulan que el grupo fosfato (carga negativa) del ATP interactúa directamente con la Lys69 y 308 (carga positiva), mientras que la adenina puede interactuar con la Arg290. Por otro lado, Kawate y colaboradores sugieren que ambas fenilalaninas (Phe) pueden participar en la transducción del cambio conformacional desde el sitio de unión al ATP hasta el canal iónico (Kawate et al., 2009).

1.2.2 Dominio transmembranal

La señal de apertura se transfiere al dominio transmembranal (TM) y permite la formación del canal iónico. La estructura de éste dominio está dada por los segmentos transmembranales de las subunidades del receptor, los cuales son hélices α , y pueden ser dos o más (Figura 2). Estos segmentos se encuentran embebidos en la membrana, en donde la hélice α expone residuos no polares que interactúan con la cadena hidrocarbonada de los fosfolípidos membranales.

En el estado “cerrado” del receptor (ligando ausente) se exponen aminoácidos no polares en el centro del poro o canal iónico. En el caso de los

receptores de *Cys-loop* hay un anillo de leucinas en el centro del canal, y en el caso de los receptores de P2X hay leucinas y alaninas (Kawate et al., 2009; Miyazawa et al., 2003; Thompson et al., 2010). Cuando el receptor se encuentra cerrado, las alaninas y las leucinas están expuestas en el lumen del poro, teniendo una función de compuerta (Kawate et al., 2009; Miyazawa et al., 2003; Thompson et al., 2010).

1.2.3 Dominio Intracelular

En el dominio intracelular hay diferentes sitios de modulación y de interacción con moléculas citoplásmicas y con otras proteínas ancladas a la membrana (revisado por (Khakh, 2001; Thompson et al., 2010)). Por ejemplo, en los receptores P2X el amino terminal y el carboxilo terminal forman parte del dominio intracelular. Además, poseen un sitio de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr) en la región carboxilo terminal, la cual puede estar relacionada con el transporte del receptor a la membrana (North, 2002). Por otro lado, en la región del amino terminal se puede encontrar un sitio consenso de PKC (Thr-X-Arg/Lys), y su ausencia podría estar relacionada con la desensibilización rápida del receptor (Khakh, 2001).

En los receptores de la familia *Cys-loop* el dominio intracelular está formado principalmente por el asa citosólica formada por los TM3 y TM4. Hay evidencia que señala que el asa puede tener diferentes funciones, una de ellas es la fosforilación ya que es susceptible a la acción de PKA y PKC (Pollock et al., 2007). También, se ha relacionado la fosforilación por PKA con la regulación del receptor (Jeanclos et al., 2001) y la fosforilación por PKC parece relacionarse con la

desensibilización o inactivación del receptor (Fenster et al., 1999). El asa citosólica juega un papel importante en la conductancia del receptor (Hales et al., 2006; Kelley et al., 2003) y se ha relacionado con el transporte y la aglutinación de los receptores de la familia *Cys-loop* (Castillo et al., 2005; Chen et al., 2007).

1.3 SUPERFAMILIA DE RECEPTORES P2X

Todos los receptores P2X son activados por ATP y median una despolarización rápida de la membrana celular al permitir el flujo rápido de cationes tales como el Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Connolly et al., 2004; Khakh et al., 2006; Vial et al., 2004a). Existen siete subunidades reportadas para estos receptores (P2X_{1-7}), cada receptor nativo puede funcionar como homotrímero o heterotrímero, con propiedades farmacológicas y biofísicas resultantes específicas, siendo siempre el ATP el agonista endógeno, revisado por (Evans, 2010).

La topología de cada subunidad está dada por un dominio extracelular, dos regiones transmembranales y un dominio intracelular formado por el amino terminal y el carboxilo terminal, revisado por (Evans, 2010; Guerlet et al., 2008).

1.3.1 Dominio extracelular. El dominio extracelular es un asa glicosilada de ~280 aminoácidos desde la región transmembranal (TM) 1 a la TM2 (Browne et al., 2010). En el asa podemos encontrar diez cisteínas conservadas en las siete subunidades (Vial et al., 2004a). El cristal del P2X_4 del pez cebra muestra cinco puentes disulfuro (numeración de zf P2X_4): Cys119-Cys168, Cys129-Cys152,

Cys135-Cys162, Cys220-Cys230, y Cys264-Cys273; podemos asumir que todas las subunidades tiene los cinco puentes disulfuro (Figura 3) (Kawate et al., 2009).

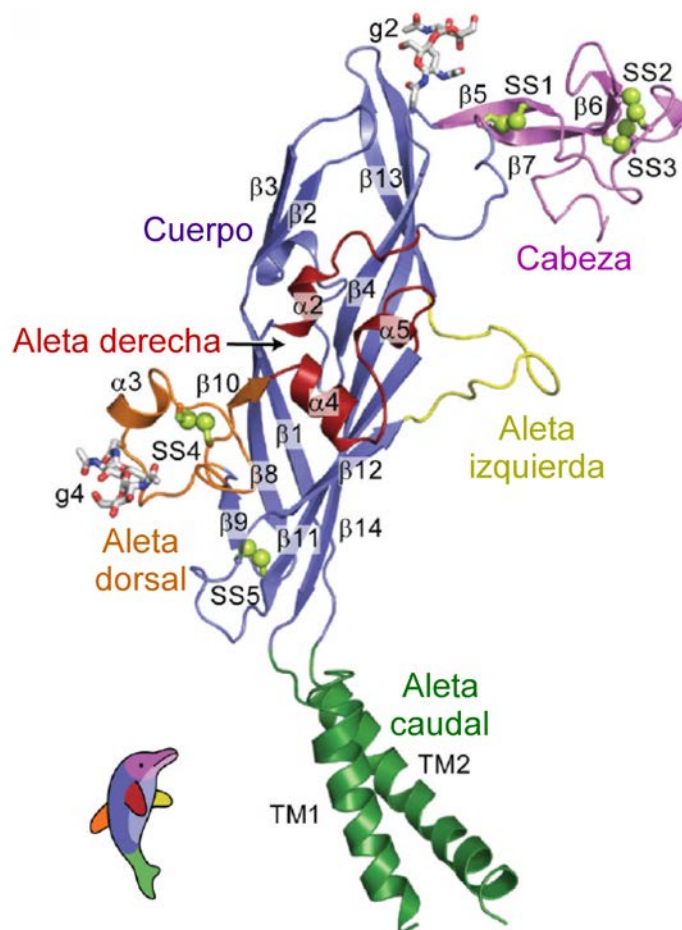


Figura 3. Diagrama de listones de la subunidad P2X₄ del pez cebra basada en su estructura cristalográfica. La subunidad P2X₄ del pez cebra asemeja a la forma de un delfín. En el dominio extracelular encontramos cuatro hélices α (α 2-3), 14 láminas β (β 1-14), puentes disulfuro (SS1-5) y glicanos enlazados (g2 y 4). En el dominio intracelular encontramos dos pases transmembranales (TM1-2). Figura tomada del artículo de Kawate et al., 2009.

El sitio de unión al ATP localizado en el asa extracelular, de acuerdo a Kawate y col. (2009), el sitio de unión al ligando estaría formado por la aleta izquierda y la cabeza de una subunidad y la aleta derecha de la subunidad

complementaria, a la ranura formada se le denomina “mandíbulas” (Figura 3). Además, podemos localizar uno de los dos diferentes mecanismos complementarios del filtro de selección, dado por un potencial electrostático negativo de largo alcance que permite concentrar iones, y está dado por la Asp59 y Asp61 (numeración de zfP2X₄) en un vestíbulo cerca de la entrada del canal iónico.

1.3.2 Dominio transmembranal: Los receptores P2X tienen dos pasajes transmembranales, TM1 y TM2. El TM1 interactúa con la parte hidrofóbica de la membrana (cadena hidrocarbonada de los fosfolípidos) y el TM2 estaría formando el lumen del poro, que también es el segundo filtro de selección iónico. Kawate y colaboradores sugieren que el ión permeante interactúa con los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo de la cadena de aminoácidos principal y secundaria que forman el canal iónico (Kawate et al., 2009).

Según Kawate y colaboradores, la compuerta del canal en el TM2 parecen ser cuatro aminoácidos en tres diferentes posiciones: una leucina que ocluye la boca del poro, una alanina en la parte más estrecha del centro del canal, y como compuerta citoplásmica una alanina y una leucina (Kawate et al., 2009). Sin embargo, un año después, Young simplificó la compuerta a la alanina en la parte más estrecha del canal (Young, 2010).

La apertura del receptor depende del segmento medio superior previo al TM2 en el dominio extracelular. Al unirse el ATP al receptor causa una rotación en contra del sentido de las manecillas del reloj de $\geq 50^\circ$ aproximadamente,

provocando el giro de las hélices α del TM2 (de las tres subunidades) quedando expuestos los átomos de oxígeno de los grupos carbonilos y provocando una separación entre los TM2 (Browne et al., 2010; Young, 2010).

1.3.3 Dominio intracelular: En el dominio intracelular, formado por el N- y C-terminal, se encuentra conservado un sitio PKC que parece estar fosforilado constitutivamente. Los cambios de éste sitio o su remoción puede acelerar la desensibilización del canal, por lo tanto el N-terminal pudiera estar participando en la regulación de la conducción del ión, contribuyendo como un vestíbulo intracelular del poro (Khakh et al., 2006; Vial et al., 2004a).

Por otro lado, en el C-terminal, también del dominio intracelular, podemos encontrar un motivo conservado relacionado con el tráfico intracelular y a la permanencia en la superficie celular (Khakh et al., 2006; Vial et al., 2004a). Cabe mencionar que el C-terminal es la región más variable en longitud de las siete subunidades (Khakh et al., 2006). Sin embargo, hay experimentos que señalan que existe otro sitio PKC en el P2X₁ de humano, ya que al remover el sitio conservado se mantenía la fosforilación del receptor (Vial et al., 2004b). Adicionalmente se ha descrito que en el P2X₇ de rata hay una Tyr343 susceptible a la fosforilación (Kim et al., 2001).

1.4 SUPERFAMILIA DE RECEPTORES CYS-LOOP

Los receptores de la superfamilia *Cys-loop* toman su nombre debido a que los miembros presentan un puente disulfuro, formado por dos cisteínas separadas por

13 residuos de aminoácidos. El resultado es un asa en la interface del dominio extracelular y transmembranal (Bouzat, 2012). La gran diferencia entre los receptores P2X y los *Cys-loop* es que no existe un ligando común que active a todos los miembros *Cys-loop*, como el ATP que activa todos los receptores P2X (Browne et al., 2010; Lester et al., 2004).

Los receptores *Cys-loop* son selectivos a cationes, por ejemplo, receptores nicotínicos activados por acetilcolina (nACh), receptores activados por la serotonina tipo tres (5-HT₃), canales iónicos activados por zinc (ZAC) y en invertebrados encontraron un canal catiónico activado por GABA (EXP-1); también existen receptores *Cys-loop* que son selectivos a aniones ácido γ -aminobutírico tipo A y C (GABA_A y GABA_C), receptores selectivos a la glicina (GlyR), y en invertebrados encontraron un receptor modulador de la locomoción defectuosa activado por la 5-hidroxitriptamina permeable a Cl⁻ (MOD-1), también en invertebrados se encontró un receptor activado por el glutamato y permeable a Cl⁻ (GluCl) (Bouzat, 2012; Lester et al., 2004).

Los receptores *Cys-loop* pueden ser hetero u homoméricos y la topología de la subunidad consiste en un dominio extracelular (N- y C-terminal), dominio transmembranal de cuatro hélices α (TM1-4), el canal lo delinea el TM2, y dominio intracelular. El dominio intracelular está formado por un asa pequeña entre el TM1 y TM2 y por un asa grande entre el TM3 y TM4 (Bouzat, 2012; Lester et al., 2004)

1.4.1 Dominio extracelular: En el dominio extracelular está el sitio de unión al ligando, compuesto por la interface de dos subunidades adyacentes. La estructura

del sitio de unión al ligando está dada por tres láminas β , que son el asa A, B y C de la interface de una subunidad, y tres láminas β que son el asa D, E y F de la subunidad complementaria (Figura 4) (Bartos et al., 2009; Brejc et al., 2001). Las asas son ricas en residuos aromáticos, como triptófano y tirosina, los cuales forman una “caja” aromática que interactúa con el agonista por interacciones cationes- π , funcionando más como una cuña que como llave-cerradura (Lester et al., 2004; Mu et al., 2003).

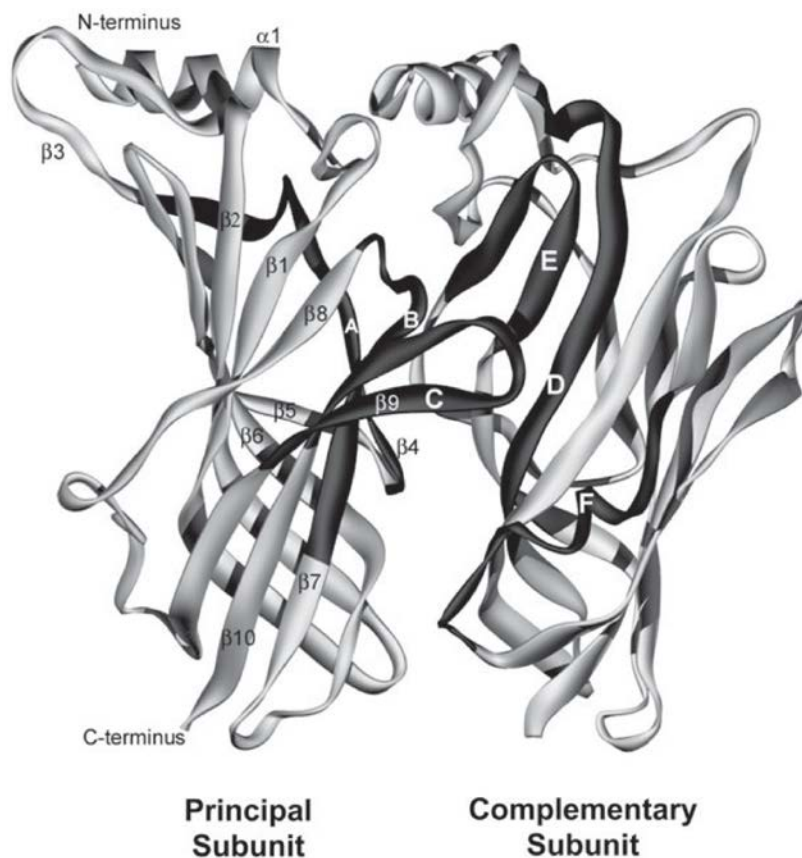


Figura 4. Diagrama de listones del sitio de unión al ligando en el dominio extracelular de un receptor *Cys-loop*. El sitio de unión al ligando está dado la interface de dos subunidades, las asas A, B y C de la subunidad α y las asas D, E y F de la subunidad complementaria, contienen los aminoácidos aromáticos que interactúan con el ligando. Imagen editada por Thompson y colaboradores (Thompson et al., 2010) del artículo Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors (Brejc et al., 2001).

1.4.2 Dominio transmembranal: La interacción ligando receptor provoca una rotación en la región de unión extracelular y mueve el *Cys-loop* provocando un contacto entre el asa $\beta 1$ y $\beta 2$ (A y B) denominada asa 2 y el “linker” entre el TM2 y TM3 que se proyecta más allá de la membrana, el contacto provoca una torsión exponiendo los residuos cargados de la región del TM2 (Cederholm et al., 2009; Lester et al., 2004; Miyazawa et al., 2003). Además de delinear el canal, el TM2 también es la compuerta del canal (en el estado cerrado) y está casi en el centro del canal en dirección al citoplasma. La compuerta se forma por un anillo de leucinas, constituido por los cuatro TM2 que forman el receptor (Bouzat, 2012; Miyazawa et al., 2003).

El filtro de selección también está en el TM2 en diferentes regiones contribuyendo en la selección del ion (en el estado abierto), a través de anillos cargados a lo largo del camino del ion (Barry et al., 2005). Sin embargo, hay un anillo arriba del anillo de leucinas que es crítico y se forma por glutamatos (carga neta -1) en receptores *Cys-loop* catiónicos, y para receptores *Cys-loop* aniónicos el anillo está formado por residuos no polares como alaninas y prolinas (Bouzat, 2012; Thompson et al., 2010).

1.4.3 Dominio intracelular: En el dominio intracelular se encuentran un asa pequeña TM1-TM2 y un asa grande TM3-TM4 la cual es una hélice α y su longitud varía entre los miembros de la familia *Cys-loop* (70-270 aminoácidos). El asa TM3-TM4 está asociada a proteínas del citoesqueleto, permitiendo la agrupación de

receptores en regiones de la membrana. Además, ésta asa contiene sitios de fosforilación que modulan la regulación positiva, la expresión y desensibilización del receptor (Bouzat, 2012; Tsetlin et al., 2011).

El asa TM3-TM4 tiene un rol en la conductancia del receptor causado por la ausencia o presencia de residuos cargados y también pueden interactuar con grupos fosfato de proteínas intracelulares (Davies et al., 1999; Thompson et al., 2010). Hay sitios PKA conservados en el asa TM3-TM4, los cuales pueden regular la desensibilización del receptor; además hay sitios PKC que pueden regular expresión celular (Sun et al., 2003; Thompson et al., 2010).

1.5 IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE LOS RECEPTORES *CYS-LOOP* Y *P2X* EN EL SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO

El sistema nervioso entérico (ENS, por sus siglas en inglés) controla las funciones del tracto gastrointestinal, a través de la inervación local en las paredes del intestino; contiene toda la maquinaria necesaria para modular y controlar el proceso de la digestión. La maquinaria está compuesta por dos plexos ganglionados, el plexo mientérico y el plexo submucoso (Figura 5) (Bertrand et al., 2004).

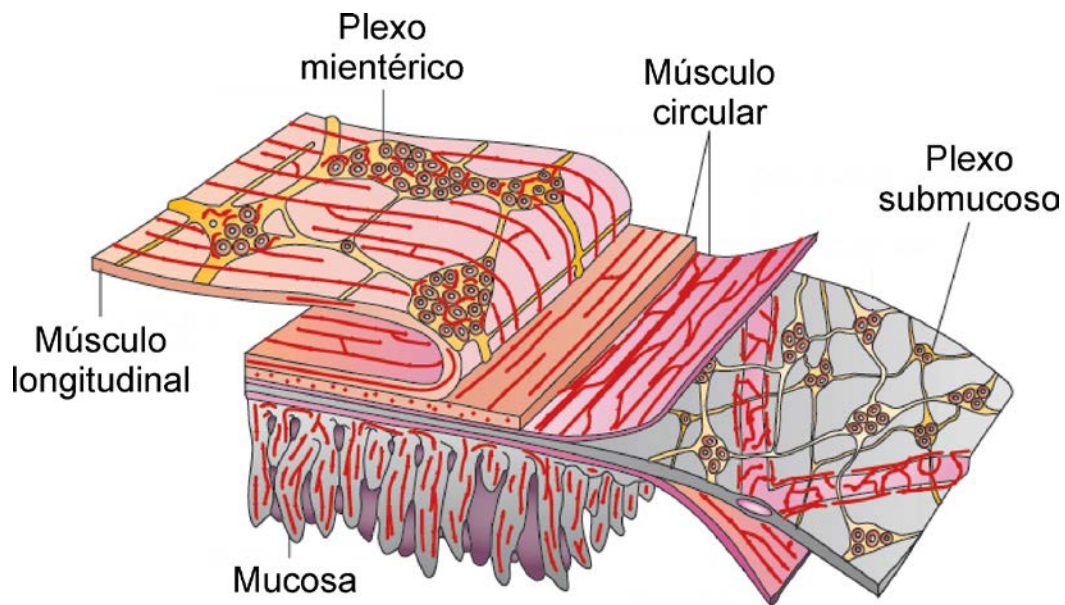


Figura 5. Representación esquemática mostrando la localización del plexo mientérico en el intestino. Figura tomada de (Furness, 2012).

El plexo mientérico provee de inervación motora y secretomotor a las dos capas de músculo y a la mucosa, respectivamente; además de inervar el músculo estriado del esófago (Goyal et al., 1996). El plexo submucoso tiene el control de la secreción y absorción en el epitelio gastrointestinal, además de modular la respuesta neuroinmune y el flujo sanguíneo (Galligan, 2002a). Uno de los mecanismos reguladores en el sistema nervioso entérico está dado por los canales activados por ligando (LGIC), estos receptores están ampliamente distribuidos a lo largo del sistema nervioso entérico (Bertrand et al., 2004; Galligan, 2002a).

La diversidad de los LGIC entéricos va desde los receptores *Cys-loop* a los receptores P2X. Específicamente, los receptores *Cys-loop* son los principales blancos farmacológicos debido a que diferentes miembros de los receptores *Cys-*

loop han sido relacionados a una amplia gama de procesos gastrointestinales en la salud y en enfermedades, por ejemplo, los receptores 5-HT₃ parecen estar involucrados en la nocicepción. Algunos antagonistas de los receptores 5-HT₃ tienen la habilidad de aliviar dolor en pacientes con el síndrome del intestino irritable (IBS por sus siglas en inglés) además, los antagonistas de los receptores 5-HT₃ son la primera línea como antieméticos y se han convertido en la primera opción terapéutica en la prevención de náusea y vómito inducido por la quimioterapia (Goodin et al., 2002; Hansen, 2003). Por otro lado, los receptores 5-HT₃ submucosos ejercen un efecto inhibitorio sobre el transporte iónico colónico liberando somatostatina de las neuronas de la submucosa (Yang et al., 2010).

Otros miembros de los receptores *Cys-loop*, activamente involucrados en la función del ENS, son los receptores nACh que actúan como la neurotransmisión excitatoria predominante en el ENS, mediando la excitación de interneuronas y motoneuronas (Bornstein et al., 2004; Galligan, 2002a).

Otra superfamilia de LGIC involucrados en el funcionamiento del ENS son los receptores P2X; ellos median, en parte, la transmisión sináptica entre interneuronas, también median la transmisión sináptica de interneuronas a motoneuronas inhibitorias, pudiendo participar en la transducción mecánica sensorial (Bertrand, 2003; Bornstein et al., 2004). Recientemente, los receptores P2X han sido propuestos como un blanco farmacológico, usando antagonistas de éstos como agentes para el tratamiento del dolor (Gum et al., 2012). Por lo tanto, ambas superfamilias de receptores, *Cys-loop* y P2X, son blancos prometedores para el tratamiento de diferentes enfermedades, incluso en diferentes partes del

ENS.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Los antagonistas de los receptores *Cys-loop* como el hexametonio, el ondansetrón, la picrotoxina y la bicuculina han sido herramientas importantes para estudiar estos receptores (Galligan, 2002a; Galligan, 2002b; Hamrouni et al., 2006; Reis et al., 2006). Generalmente, estos antagonistas se han considerado como específicos sobre un subgrupo de los receptores *Cys-loop*: el hexametonio sobre los receptores nACh, el ondansetrón sobre los receptores 5-HT₃ y la picrotoxina y la bicuculina sobre los receptores GABA_A (Chebib et al., 2000; Fargeas et al., 1988; Reis et al., 2006; Roerig et al., 1997). Sin embargo, la evidencia experimental indica que algunos de ellos pueden afectar más de un subgrupo de receptores *Cys-loop*. Por ejemplo, sobre neuronas del ganglio estomatogástrico del cangrejo, la picrotoxina también inhibe las respuestas postsinápticas despolarizantes a la ACh (Marder et al., 1980) y los receptores ACh recombinantes de rata (Erkkila et al., 2004). Además, el ondansetrón también tiene acción inhibitoria sobre los receptores nACh musculares expresados en ovocitos de *Xenopus leavis* (Paul et al., 2005). En ganglios sensoriales y autonómicos de gato, la picrotoxina también inhibe las acciones despolarizantes de la 5-HT (Simonds et al., 1980), así como los receptores 5-HT₃ recombinantes murinos (Das et al., 2003).

A pesar de su importancia, la especificidad de estos antagonistas comúnmente usados sobre receptores *Cys-loop* nativos, sobre neuronas mientéricas no ha sido investigada.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la selectividad de antagonistas para los receptores nativos *Cys-loop* para la ACh, 5-HT y GABA en neuronas mientéricas de cobayo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si el hexametonio sólo inhibe a los receptores nACh.
- Estudiar si la picrotoxina y la bicuculina inhiben específicamente a los receptores GABA_A,
- Investigar si el ondansetrón sólo inhibe a los receptores 5-HT₃.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Disección del Plexo Mientérico de Cobayo

Se usaron cobayos jóvenes (150-200 g), hembras o machos y fueron sacrificados por decapitación. Se tomaron segmentos de cinco centímetros del yeyuno proximal y se colocaron en solución modificada de Krebs (en mM): NaCl 126, NaH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, KCl 5, NaHCO₃ 25, glucosa 11; se gaseó con 95% de O₂ y 5% de CO₂, después de abrir longitudinalmente. La mucosa y la capa submucosa del intestino se removieron junto con la mayor parte de la capa del músculo circular, dejando sólo la capa de músculo longitudinal con el plexo mientérico embebido en ella.

2.2 Cultivo Neuronal Primario

La preparación mientérica fue disociada usando un tratamiento secuencial con dos soluciones enzimáticas, descritas previamente por Barajas-López y colaboradores (Barajas-Lopez et al., 1996a), la primera contiene papaína (0.01 mg/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 por lavados con medio L15 y las neuronas fueron colocadas en cubreobjetos redondos cubiertos con colágeno estéril de cola de rata. Para cultivar las neuronas se utilizó medio mínimo esencial

97.5%, conteniendo 2.5% de suero de cobayo, L-glutamina 2mM, penicilina 10 U/ml, estreptomina 10 µg/ ml y glucosa 15 mM.

2.3 Electrofisiología

Las corrientes fueron registradas con el amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices), el registro y análisis se hizo con Axoscope 9.0 (PC) y Axograph 4.0 (Macintosh software), respectivamente. Para medir las corrientes inducidas por los neurotransmisores se utilizó *patch clamp* en la configuración de célula completa y fijación de voltaje. Los cultivos primarios fueron de corto plazo (24-72 h) para prevenir problemas de fijación de voltaje debido al crecimiento de neuritas. Las pipetas de *patch clamp* fueron hechas como se describió previamente por Barajas-López y colaboradores (Barajas-Lopez et al., 1996a) y la resistencia de acceso de las pipetas en las soluciones usadas fueron de 1-5 MΩ. Todas las mediciones fueron hechas a un potencial de -60 mV.

2.4 Soluciones

ACh, GABA y 5-HT₃ son conocidas por modular canales de potasio membranales de neuronas entéricas por la vía de receptores acoplados a proteínas G (Barajas-Lopez et al., 2000; Christofi et al., 1997; Nakajima et al., 1996). Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de Cs⁺ (bloqueador de canales de potasio), para disminuir la respuesta de receptores acoplados a proteínas G. La composición de la solución externa para hacer los experimentos fue (en mM): CaCl₂•2H₂O 2, CsCl 3, glucosa 11, HEPES 4.8, NaCl 160 y se ajustó el pH a 7.3-7.4 con NaOH; la

solución de la pipeta estaba compuesta por (en mM): CsCl 150, EGTA 10, HEPES 5, NaCl 10, ATPMg 4.5, GTP 0.1 y se ajustó el pH a 7.3-7.4 con CsOH. La cámara de registro fue continuamente perfundida a una tasa de flujo aproximado de 2 ml/min.

2.5 Aplicación de las Sustancias

Las soluciones experimentales fueron aplicadas por medio de un dispositivo de ocho tubos que permite el cambio rápido entre la solución control y la experimental. Cada tubo está conectado a una jeringa; cada jeringa con solución control externa con o sin la sustancia experimental. La aplicación de las sustancias fue hecha colocando la solución control frente a la neurona siendo registrada y la aplicación de la sustancia experimental se hizo cambiando rápidamente al tubo que contenía la solución control más la sustancia(s) problema(s) y regresando al tubo con la solución control para obtener el lavado. La duración de la aplicación de cada sustancia fue aproximadamente por 5 segundos impulsada por gravedad, ajustando los cambios en el nivel del volumen para evitar cualquier variación en el flujo. Los experimentos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente (~23° C). Para estudiar el efecto de los antagonistas, primero aplicamos el agonista por ~5 segundos (controles), entonces aplicamos el agonista más el antagonista a concentraciones crecientes por ~5 segundos y finalmente repetimos el control; entre las aplicaciones de las sustancias esperamos 5 minutos para evitar la desensibilización del receptor.

2.6 Adquisición de las Sustancias

El hexametonio se adquirió de Research Biomedical Inc. (Natick, MA, USA). El resto de las sustancias fueron adquiridas de Sigma (St. Louis, MO., USA). La adición de otras sustancias no altera el pH de la solución externa.

2.7 Análisis de Datos

Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. Las curvas concentración respuestas aquí obtenidas se hicieron usando la ecuación de Hill como sigue:

$$y = I/I_{\max}(x^n/EC_{50}^n+x^n)$$

Donde y es I/I_{\max} (I = amplitud de respuesta), I_{\max} es la respuesta máxima, EC_{50} es la concentración efectiva para conseguir el 50% de la respuesta máxima, n es la pendiente (coeficiente de Hill), y x es la concentración de la sustancia. Para los antagonistas I_{\max} se consideró como 100%.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Propiedades generales de las corrientes de célula completa mediadas por receptores Cys-loop en neuronas mientéricas de cobayo

La aplicación de ACh (1 mM) indujo una corriente entrante rápida (I_{ACh}) de por lo menos -200 pA en el 84% de del total de 64 neuronas, estas células tuvieron una corriente promedio de -1313 ± 136 pA. La amplitud de la corriente fue graficada en función de la concentración de ACh y los datos fueron analizados usando un modelo logístico arrojando una EC_{50} de 51 y un coeficiente de Hill de 1.8 ± 0.04 (Fig. 6).

La aplicación de la serotonina (1 mM) también indujo una corriente entrante rápida (I_{5-HT}) de por lo menos -200 pA en el 92% de las 71 neuronas analizadas, las cuales tuvieron una corriente promedio de -1681 ± 120 pA en respuesta a 1 mM. La EC_{50} para la serotonina fue de 66 μ M y un coeficiente de Hill de 0.89 ± 0.09 (Fig. 6).

La aplicación de GABA (1 mM) también indujo una corriente entrante (I_{GABA}) igual o mayor a 200 pA en el 79% de un total de 80 neuronas. La EC_{50} y un coeficiente de Hill fueron 123 μ M y 1.1 ± 0.2 , respectivamente (Fig. 6)

Las amplitudes de estas tres corrientes son expresadas independientemente, como se muestra por los bajos coeficientes de correlación (<0.25) obtenidos cuando los datos en la Figura 7A-C fueron ajustados a una función lineal. Además, no se observó la desensibilización cruzada entre los

receptores nicotínicos, 5-HT₃ y GABA_A en neuronas mientéricas. Por lo tanto, la activación por aproximadamente 90 s de un canal, la desensibilización de su receptor no afecta la amplitud de la corriente mediada por los otros canales (Fig 8A y 8B).

3.2 Efecto de diferentes antagonistas sobre los receptores Cys-loop presentes en neuronas mientéricas

3.2.1 El hexametonio inhibió específicamente los receptores nicotínicos

El hexametonio es usado frecuentemente para bloquear los efectos colinérgicos mediado por los receptores nicotínicos, por tanto, nosotros estudiamos su efecto sobre los receptores *Cys-loop* presentes en neuronas mientéricas para investigar su especificidad. La corriente inducida por la ACh fue inhibida en forma dependiente de la concentración por el hexametonio (Fig. 9A), el efecto fue revertido después de remover el inhibidor. La IC₅₀ y el coeficiente de Hill fueron 11 μM y 0.79±0.1, respectivamente (Figura 9A). El efecto inhibitorio del hexametonio fue específico sobre los receptores nicotínicos debido a que el hexametonio no afectó las corrientes inducidas por GABA o 5-HT, aún a la concentración de 100 μM, la cual inhibió el 90% de la I_{ACh} (Fig. 9B). El efecto del hexametonio se revirtió después de cinco minutos de lavado (datos no mostrados).

3.2.2 La bicuculina y picrotoxina inhibieron los tres receptores Cys-loop de las neuronas mientéricas

Las corrientes de célula completa inucidas por GABA, ACh y 5-HT fueron inhibidas, de manera reversible, por la bicuculina (Fig. 10A). Estos efectos fueron dependientes de la concentración con las IC_{50} de 5.8, 15 y 191 μ M, y coeficiente de Hill de 1.04 ± 0.12 , 0.80 ± 0.08 y 1.02 ± 0.43 , para receptores $GABA_A$, nicotínico y 5-HT₃, respectivamente (Fig. 10B). Las concentraciones de bicuculina ≤ 100 μ M fueron usadas para evitar mayores concentraciones del solvente para solubilizar la bicuculina (DMSO).

La picrotoxina tuvo efecto inhibitorio sobre los receptores $GABA_A$, nicotínicos y 5-HT₃ (Fig. 6A). Este efecto fue en función de la concentración (Fig. 11B) y las IC_{50} s fueron 10, 55 y 444 μ M, respectivamente. Los valores de los coeficientes de Hill fueron 0.75 ± 0.09 , 0.86 ± 0.11 y 1.2 ± 0.16 , respectivamente. Los efectos de la bicuculina y la picrotoxina fueron reversibles después de cinco minutos de lavado.

3.2.3 El ondansetrón inhibió sólo a los receptores 5-HT₃ y nicotínicos

El onadasetrón inhibió a las I_{5-HT} e I_{ACh} (Fig. 12A), pero no tuvo efecto sobre las I_{GABA} a la concentración de 10 μ M. El efecto sobre las I_{5-HT} e I_{ACh} fue dependiente de la concentración y reversible (Fig. 7B), con una IC_{50} de 0.05 y 3.9 μ M y coeficientes de Hill de 0.77 ± 0.1 y 0.67 ± 0.07 , respectivamente. Estos efectos fueron reversibles después de cinco minutos de lavado.

El efecto y potencia de los antagonistas aquí probados se resumen en la Tabla 1.

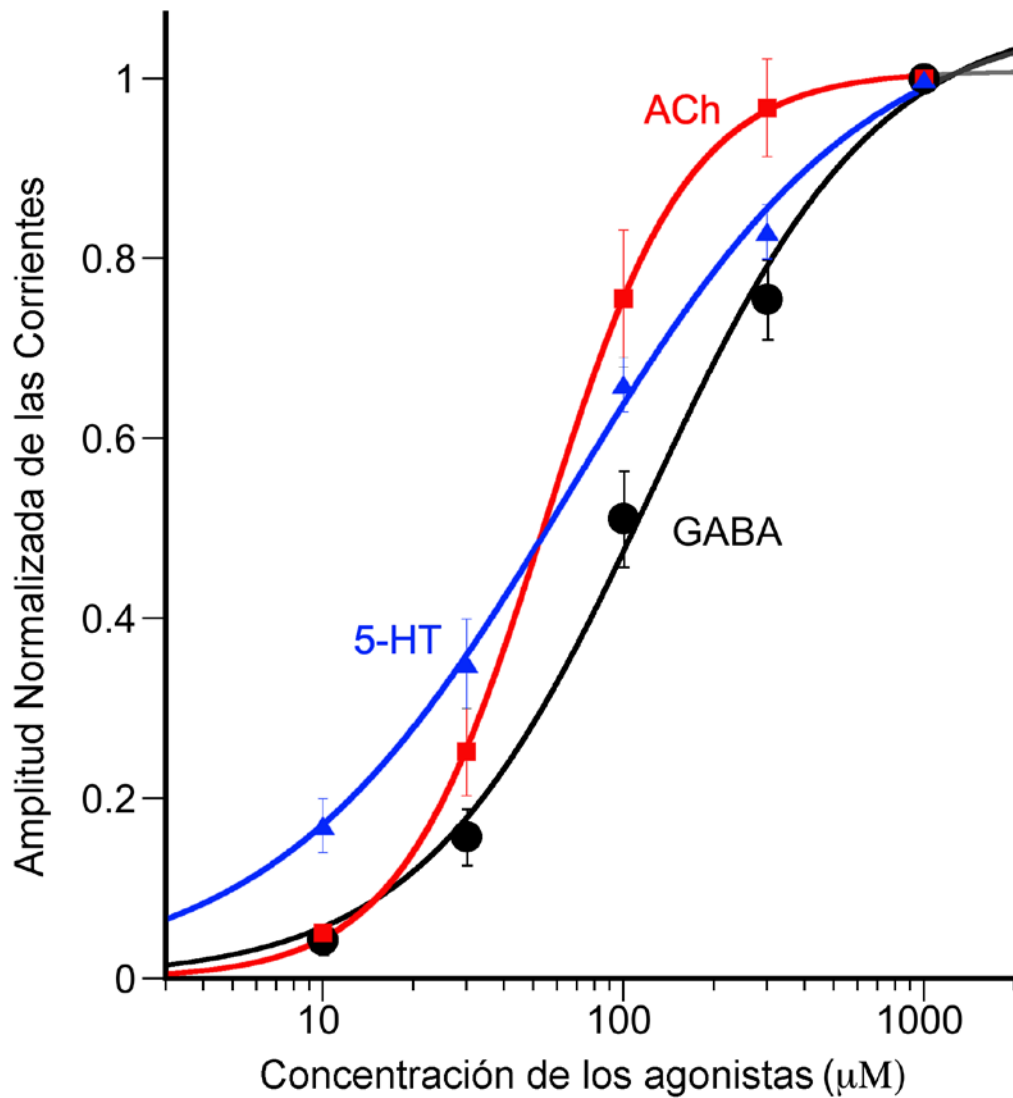


Figura 6. Curva concentración respuesta de los agonistas de los receptores *Cys-loop* presentes en neuronas mientéricas. Las corrientes de célula completa en neuronas mientéricas inducidas fueron a concentraciones crecientes (10-1000 μM) de la ACh, la 5-HT y el GABA. Las EC_{50} s fueron 55, 66 y 123 μM , respectivamente. Las corrientes fueron normalizadas considerando la amplitud a la respuesta de 1 mM como la unidad. Los símbolos y las líneas representan las medias ($n=4-12$) y E.E.M., respectivamente. Las corrientes fueron registradas a un potencial de -60 mV. La aplicación de los agonistas fue hecha cada 5 minutos para evitar la desensibilización del receptor.

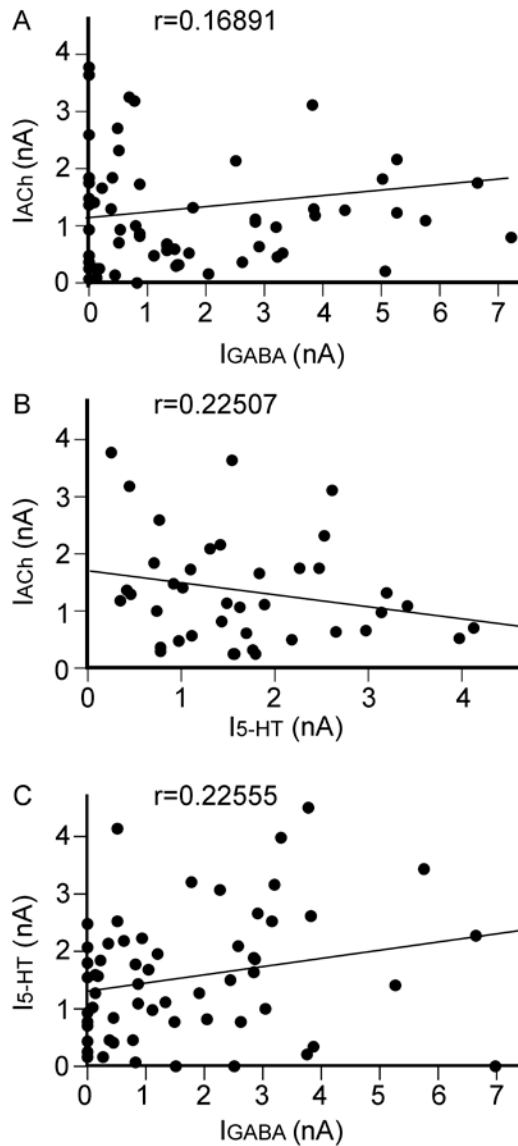


Figura 7. Receptores nACh, 5-HT₃ y GABA_A son expresados independientemente uno de los otros. A) Corriente inducida por la ACh frente a una corriente inducida por el GABA en la misma neurona mientérica. B) Corriente inducida por la ACh frente a una corriente inducida por la 5-HT en la misma neurona mientérica. C) Corriente inducida por la 5-HT contra a una corriente inducida por el GABA en la misma neurona mientérica. Los coeficiente de correlación fueron <0.25 para todos los casos. Las líneas representan el mejor ajuste a una función lineal. Las corrientes fueron obtenidas a un potencial fijo de -60 mV en respuesta a la concentración de 1 mM del agonista. Cada punto representa una neurona mientérica.

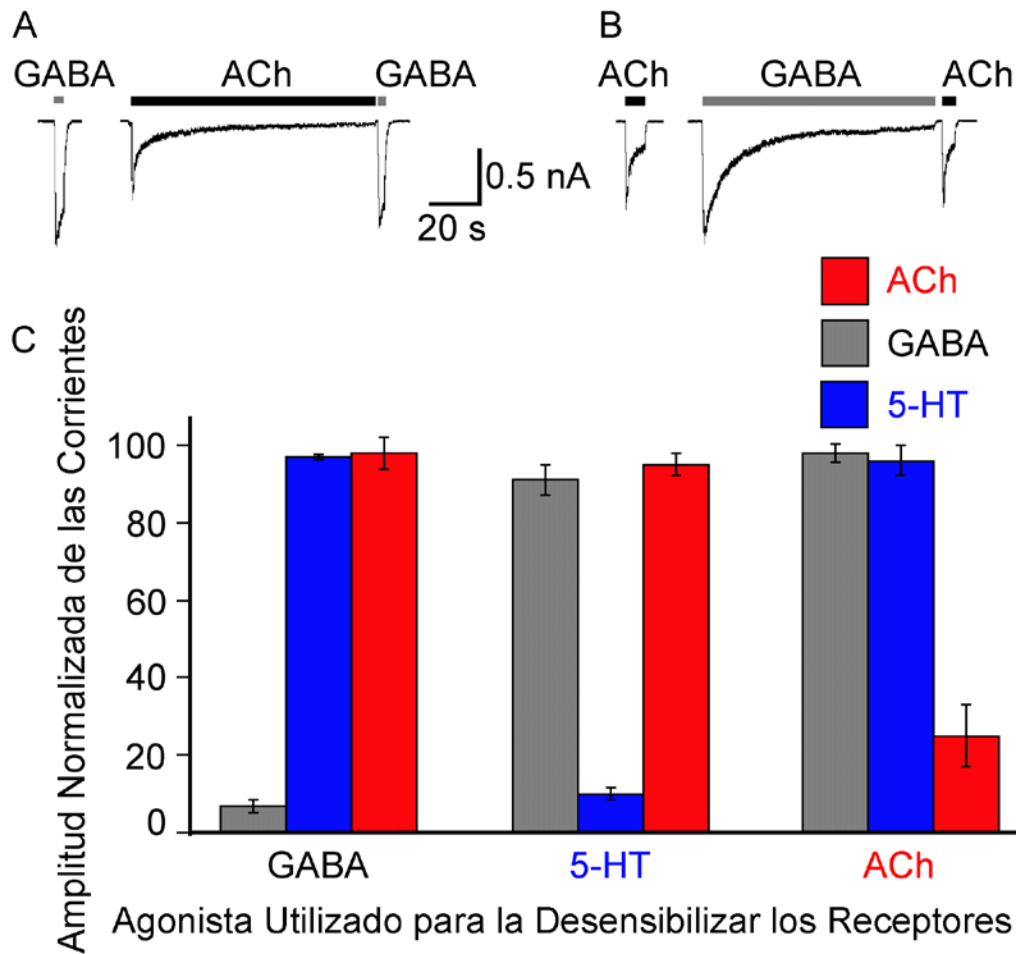


Figura 8. Activación de receptores nACh, 5-HT₃ y GABA_A desensibiliza a su propio receptor. La amplitud de las corrientes, respuesta a cualquiera de estos tres agonistas, fueron medidas antes y después de una larga aplicación (90 s) de la ACh, el GABA o la 5-HT. A) Amplitud de corriente inducida por el GABA antes (trazo izquierdo) y después de una larga aplicación de la ACh. B) Amplitud de corriente inducida por la ACh antes (trazo izquierdo) y después de una larga aplicación del GABA. C) Las barras y las líneas sobre las barras representan las medias y E.E.M. de cinco experimentos similares a aquellos mostrados en A y B. Todos los registros fueron obtenidos a un potencial fijo de -60 mV y las corrientes inducidas fueron a una concentración de 1 mM del agonista.

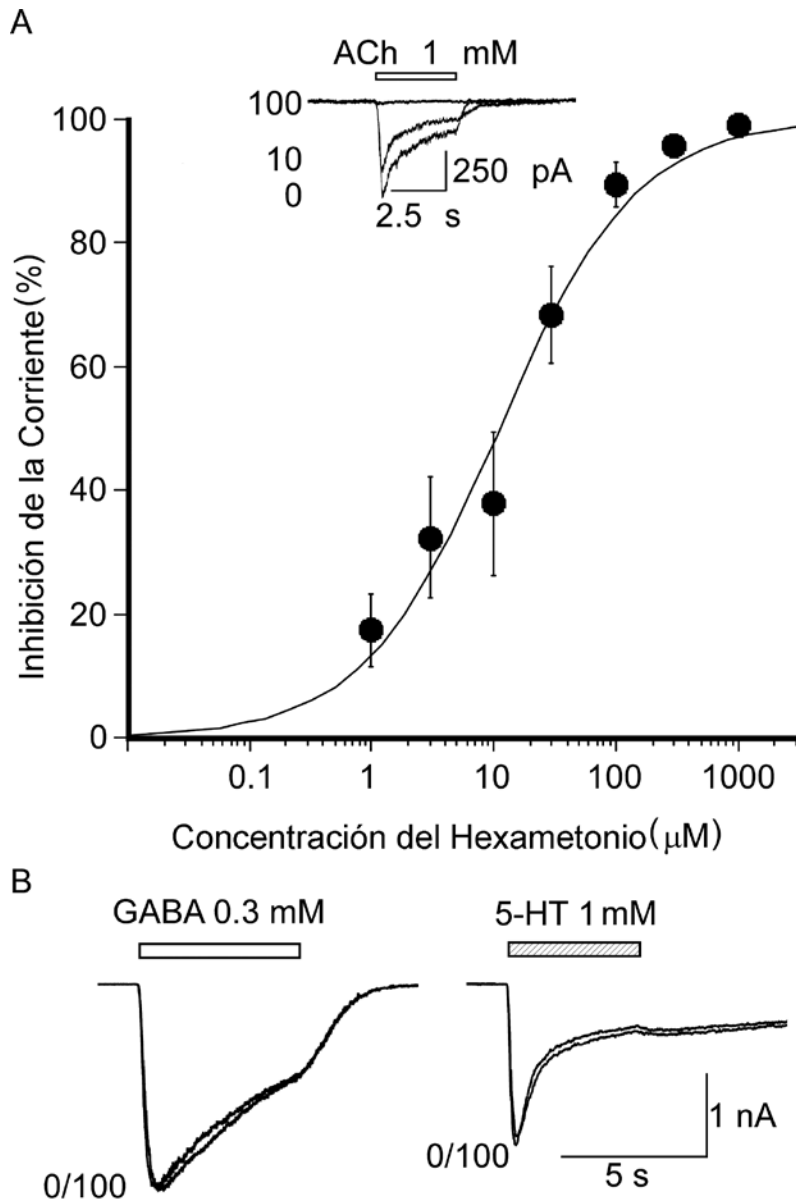


Figura 9. El hexametonio (HEX) inhibió específicamente a los receptores nACh dependiendo de la concentración. A) Las corrientes de célula completa inducidas por la ACh (1 mM) a concentraciones crecientes del hexametonio a las concentraciones señaladas al lado de los registros. *Recuadro* muestra algunos registros típicos inducidos por la ACh. Los círculos negros y las líneas son las medias y los E.E.M (n=3-6). B) Corrientes inducidas por el GABA (0.3 mM) y la 5-HT (1 mM) antes y en presencia del hexametonio (100 µM), la ausencia de efecto fue observado en las cuatro diferentes neuronas mientéricas. Todos los registros fueron obtenidos a un potencial fijo de -60 mV y las aplicaciones de los agonistas fueron hechas cada 5 minutos.

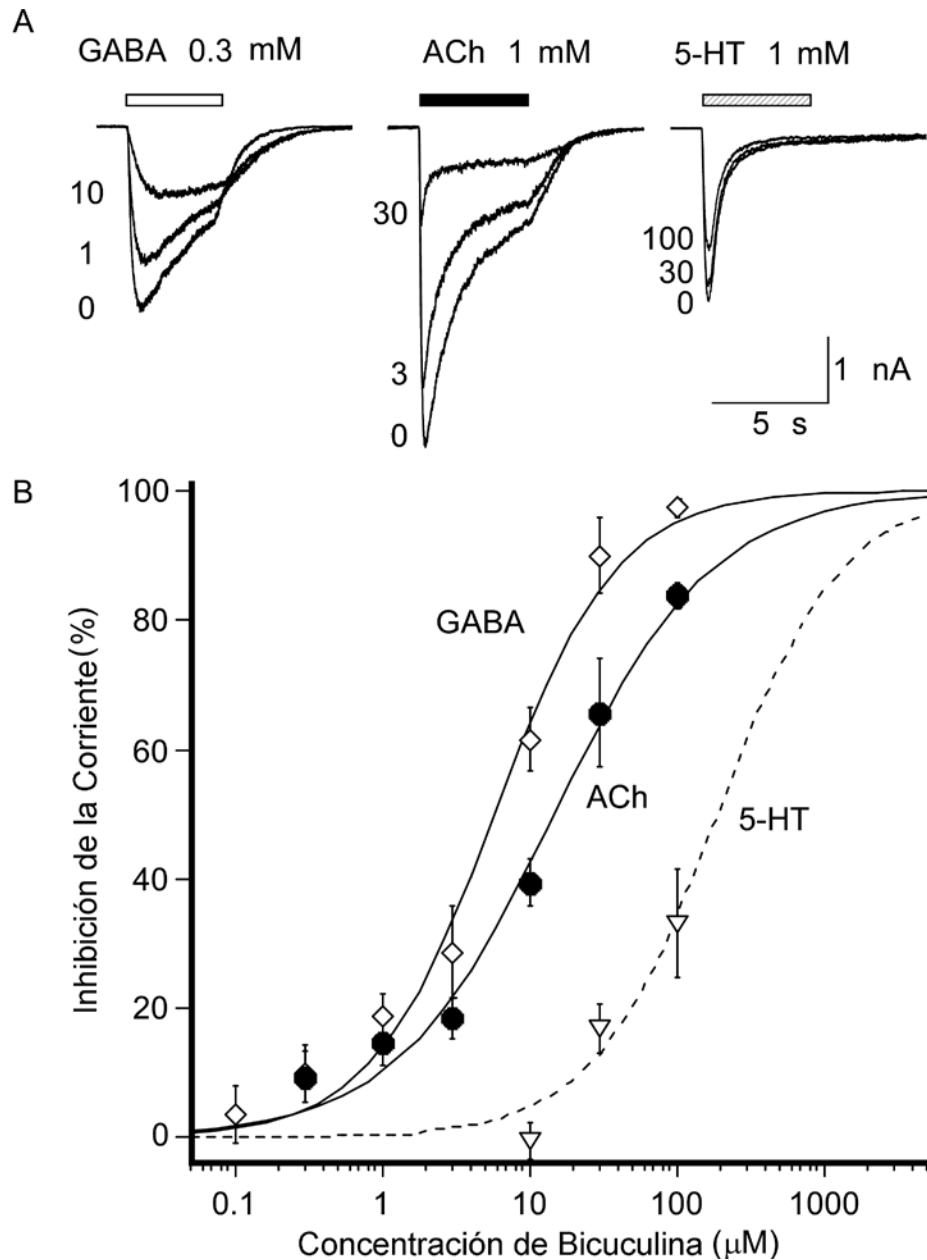


Figura 10. La bicuculina inhibe a los receptores GABA_A, nACh y 5-HT₃. A) Las corrientes inducidas por el GABA (0.3 mM), la ACh (1 mM) y la 5-HT (1 mM) fueron obtenidas antes y en presencia de la bicuculina a las concentraciones señaladas al lado de los registros. Las corrientes de cada panel fueron medidas de una misma neurona mientras a un potencial fijo de -60 mV. B) Curvas concentración respuesta para los efectos inhibitorios de la bicuculina (0.1-100 μM) sobre las corrientes inducidas por el GABA, la ACh y la 5-HT (n=3-13). La IC₅₀ para los receptores el GABA_A, nicotínicos y 5-HT₃ son de 5.8, 15 y 191 μM , respectivamente. Los símbolos y las líneas representan las medias y los E.E.M., respectivamente.

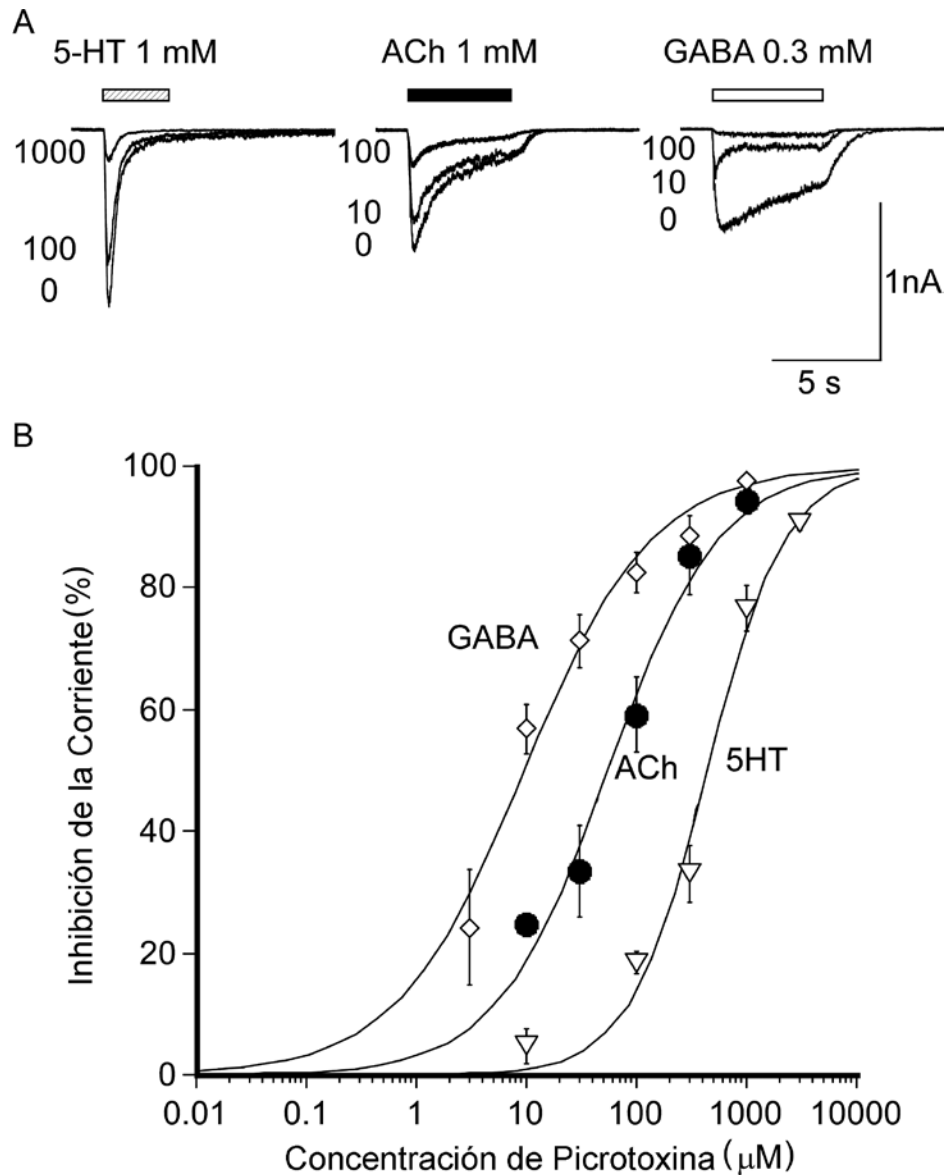


Figura 11. La picrotoxina inhibe a los receptores GABA_A , nACh y 5-HT_3 . A) Corrientes entrantes de célula completa inducidas por la 5-HT (1 mM), la ACh (1 mM) y el GABA (0.3 mM) en presencia de la picrotoxina a las concentraciones señaladas al lado de los registros. Las corrientes mostradas en cada panel fueron medidas en la misma neurona mientérica a un potencial de -60 mV y fueron inducidas cada cinco minutos. B) Curva concentración respuesta de los efectos inhibitorios de la picrotoxina (3-3000 μM) sobre las corrientes inducidas por el GABA, la ACh y la 5-HT, las IC_{50} s fueron 10, 55, y 444 μM , respectivamente (n=3-5). Los símbolos y líneas representan las medias y los E.E.M. respectivamente.

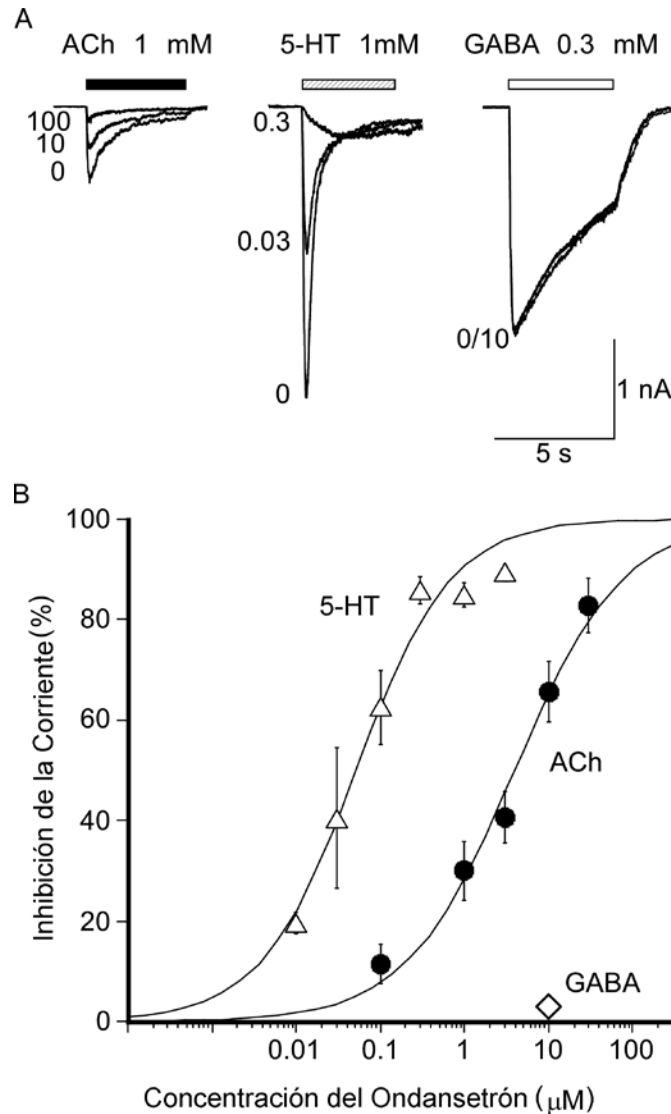


Figura 12. El ondansetrón inhibe las corrientes inducidas por la 5-HT y la ACh pero no las corrientes inducidas por el GABA. A) Corrientes entrantes de célula completa inducidas por la ACh (1 mM), la 5-HT (1 mM) y el GABA (0.3 mM) en ausencia y presencia del ondansetrón a las concentraciones señaladas al lado de los registros. Las corrientes mostradas en cada panel fueron obtenidas de la misma neurona a un potencial fijo de -60 mV y los agonistas fueron aplicados cada cinco minutos. B) Curvas concentración respuesta del ondansetrón (0.01-30 μM) sobre las corrientes inducidas por la 5-HT y la ACh, las IC_{50} s son 0.05 y 4 μM , respectivamente (n=4-10). Los símbolos y líneas representan las medias y los E.E.M. respectivamente.

Tabla 1. IC₅₀ (en μM) de diferentes antagonistas de los receptores *Cys-loop*.

<i>Antagonista</i>	<i>Hexametonio</i>	<i>Ondansetrón</i>	<i>Bicuculina</i>	<i>Picrotoxina</i>
Receptor				
GABA _A	NE	NE	5.8	10
nACh	11	3.9	15	55
5-HT ₃	NE	0.05	191	444

Las IC₅₀s fueron calculadas de las curvas concentración respuesta mostradas en las Figuras 4-7. NE, no se observó efecto.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Nuestras observaciones mostraron que, en neuronas mientéricas, el efecto de ACh, GABA y 5-HT es específico sobre receptores nicotínicos, GABA_A y 5-HT₃, a pesar de las relativamente altas concentraciones usadas en el presente trabajo. Además, excepto para el hexametonio, los otros inhibidores no fueron tan específicos. Es relevante que los receptores nicotínicos, los cuales juegan una función central en la neurotransmisión sináptica del sistema nervioso entérico, son inhibidos por bicuculina, picrotoxina y ondansetrón. Nuestro estudio implica que se debe prestar cuidado especial cuando los antagonistas de receptores 5-HT₃ y GABA_A son usados en protocolos experimentales dirigidos al estudio de las funciones de dichos receptores, debido a que podrían actuar sobre los receptores nicotínicos.

Se ha demostrado que los receptores nicotínicos, GABA_A y 5-HT₃ están constituidos por diferentes conjuntos de proteínas (Thompson et al., 2010), las cuales son activadas específicamente por sus agonistas endógenos ACh, GABA y 5-HT, respectivamente. De acuerdo con esto, en neuronas mientéricas, estos receptores son: i) expresados independientemente uno del otro, ii) su desensibilización es independiente, y iii) los tres receptores tienen diferente perfil a antagonistas, lo cual se resume en la Tabla 1. En conjunto, estos resultados mostraron que, en neuronas mientéricas, el efecto de cada inhibidor es específico

sólo sobre uno de los receptores *Cys-loop* a pesar de las relativamente altas concentraciones (0.3-1 mM) aquí usados.

Los receptores nicotínicos fueron bloqueados específicamente por el hexametonio, pero también fueron blanco del ondansetrón, un antagonista de los receptores 5-HT₃, y por la bicuculina y picrotoxina, antagonistas de los receptores GABA_A. De hecho, el ondansetrón es aproximadamente tres veces más potente que el hexametonio sobre los receptores nicotínicos. Estos hallazgos son relevantes debido a que ondansetrón, bicuculina y picrotoxina, son usados frecuentemente para inhibir los receptores 5-HT₃ o GABA_A en preparaciones que también expresan receptores nicotínicos (Alkondon et al., 1998; Dickson et al., 2010; Hilmas et al., 2001; Kadowaki et al., 1996; Monro et al., 2002) y algunos antagonistas son considerados específicos (Roerig et al., 1997). Los receptores nicotínicos son 78 veces menos sensibles al ondansetrón que los receptores 5-HT₃ en neuronas mientéricas.

En mamíferos, los receptores 5-HT₃ están formados por la combinación de hasta cinco diferentes subunidades, llamadas 5-HT_{3A-E} (Thompson et al., 2013). Una heterogeneidad del receptor es obtenida mediante splicing alternativo. Además, dos variantes han sido reportadas para los 5-HT_{3A}, una corta y una larga. La coexpresión de la subunidad 5-HT_{3A} y con la subunidad 5-HT_{3B} resulta en un receptor heteromérico que imita una conductancia alta de canal único en algunas poblaciones de receptores nativos del sistema nervioso periférico. Varios estudios han reportado que la picrotoxina (Das et al., 2003) y la bicuculina (Sun et al., 2000) inhiben a los receptores 5-HT_{3A}, en forma no competitiva y competitiva,

respectivamente. La coexpresión de la subunidad 5-HT_{3B} con subunidades 5-HT_{3A} disminuye 100 veces la potencia de la picrotoxina (Das et al., 2003). Por lo tanto, la picrotoxina tiene una selectividad útil entre receptores 5-HT₃ homoméricos y heteroméricos. Varias de nuestras observaciones indican que los receptores 5-HT₃ de las neuronas mientéricas son heteroméricas, debido a su baja sensibilidad a la 5-HT y a la picrotoxina. En concordancia con nuestra interpretación, los canales únicos de 5-HT₃ han sido registrados con conductancias de 15 y 9 pS (Derkach et al., 1989), mientras que la conductancia del canal único del receptor 5-HT_{3A} ha sido estimada en aproximadamente 0.4 pS y cuando la subunidad 5-HT_{3B} es introducida, la conductancia del canal se eleva hasta 16 pS (Kelley et al., 2003). Por consiguiente, las corrientes macroscópicas aquí registradas en neuronas mientéricas están probablemente mediadas por receptores 5-HT₃ heteroméricos.

4.1 Conclusiones

En resumen, el hexametonio es un antagonista de los receptores nicotínicos presentes en neuronas mientéricas y concentraciones alrededor de 1 mM son requeridas para bloquear completamente estos canales. La bicuculina y picrotoxina inhiben al máximo las I_{GABA} a concentraciones de 0.1 y 1 mM, respectivamente; sin embargo, estas concentraciones también inhiben los receptores nicotínicos y 5-HT₃ mientéricos. El ondansetrón inhibe completamente a los receptores 5-HT₃ a la concentración de 1 μ M; sin embargo, a esta concentración también afecta la I_{ACh} pero no la I_{GABA} . Por lo tanto, estas observaciones deben ser consideradas cuando son usados los antagonistas de los

receptores 5-HT₃ y GABA_A en protocolos experimentales dirigidos al estudio de las funciones de dichos receptores, en particular cuando los receptores nicotínicos están presentes en el modelo experimental.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por CONACYT, México (Proyecto no. 48297). Las becas de EH-J (204156), MM-M y FO-C fueron financiadas por CONACYT.

CAPÍTULO 5

REFERENCIAS

Absalom, N.L., Lewis, T.M., Schofield, P.R. 2004. Mechanisms of channel gating of the ligand-gated ion channel superfamily inferred from protein structure. *Experimental physiology* 89, 145-153.

Albertson, T.E., Peterson, S.L., Stark, L.G., Lakin, M.L., Winters, W.D. 1981. The anticonvulsant properties of melatonin on kindled seizures in rats. *Neuropharmacology* 20, 61-66.

Alkondon, M., Pereira, E.F., Albuquerque, E.X. 1998. alpha-bungarotoxin- and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices. *Brain research* 810, 257-263.

Barajas-Lopez, C., Espinosa-Luna, R., Christofi, F.L. 2000. Changes in intracellular Ca²⁺ by activation of P2 receptors in submucosal neurons in short-term cultures. *European journal of pharmacology* 409, 243-257.

Barajas-Lopez, C., Peres, A.L., Espinosa-Luna, R. 1996a. Cellular mechanisms underlying adenosine actions on cholinergic transmission in enteric neurons. *The American journal of physiology* 271, C264-275.

Barajas-Lopez, C., Peres, A.L., Espinosa-Luna, R., Reyes-Vazquez, C., Prieto-Gomez, B. 1996b. Melatonin modulates cholinergic transmission by blocking nicotinic channels in the guinea-pig submucous plexus. *European journal of pharmacology* 312, 319-325.

Barcroft, J. 1913. The Combinations of Haemoglobin with Oxygen and with Carbon Monoxide. II. The Biochemical journal 7, 481-491.

Barmashenko, G., Hefft, S., Aertsen, A., Kirschstein, T., Kohling, R. 2011. Positive shifts of the GABAA receptor reversal potential due to altered chloride homeostasis is widespread after status epilepticus. *Epilepsia* 52, 1570-1578.

Barry, P.H., Lynch, J.W. 2005. Ligand-gated channels. *IEEE Trans Nanobioscience* 4, 70-80.

Bartos, M., Corradi, J., Bouzat, C. 2009. Structural basis of activation of cys-loop receptors: the extracellular-transmembrane interface as a coupling region. *Molecular neurobiology* 40, 236-252.

Bertrand, P.P. 2003. ATP and sensory transduction in the enteric nervous system. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 9, 243-260.

Bertrand, P.P., Thomas, E.A. 2004. Multiple levels of sensory integration in the intrinsic sensory neurons of the enteric nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31, 745-755.

Bornstein, J.C., Costa, M., Grider, J.R. 2004. Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 16 Suppl 1, 34-38.

Bouzat, C. 2012. New insights into the structural bases of activation of Cys-loop receptors. *Journal of physiology, Paris* 106, 23-33.

Brejč, K., van Dijk, W.J., Klaassen, R.V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A.B., Sixma, T.K. 2001. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411, 269-276.

Browne, L.E., Jiang, L.H., North, R.A. 2010. New structure enlivens interest in P2X receptors. *Trends in pharmacological sciences* 31, 229-237.

Castillo, M., Mulet, J., Gutierrez, L.M., Ortiz, J.A., Castelan, F., Gerber, S., Sala, S., Sala, F., Criado, M. 2005. Dual role of the RIC-3 protein in trafficking of serotonin and nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of biological chemistry* 280, 27062-27068.

Cederholm, J.M., Schofield, P.R., Lewis, T.M. 2009. Gating mechanisms in Cys-loop receptors. *European biophysics journal : EBJ* 39, 37-49.

Colon-Ramos, D.A. 2009. Synapse formation in developing neural circuits. *Current topics in developmental biology* 87, 53-79.

Connolly, C.N., Wafford, K.A. 2004. The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochemical Society transactions* 32, 529-534.

Chebib, M., Johnston, G.A. 2000. GABA-Activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *J Med Chem* 43, 1427-1447.

Chen, Z.W., Olsen, R.W. 2007. GABAA receptor associated proteins: a key factor regulating GABAA receptor function. *Journal of neurochemistry* 100, 279-294.

Christofi, F.L., Guan, Z., Wood, J.D., Baidan, L.V., Stokes, B.T. 1997. Purinergic Ca²⁺ signaling in myenteric neurons via P2 purinoceptors. *The American journal of physiology* 272, G463-473.

Das, P., Dillon, G.H. 2003. The 5-HT3B subunit confers reduced sensitivity to picrotoxin when co-expressed with the 5-HT3A receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 119, 207-212.

Davies, P.A., Pistis, M., Hanna, M.C., Peters, J.A., Lambert, J.J., Hales, T.G., Kirkness, E.F. 1999. The 5-HT3B subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397, 359-363.

Derkach, V., Surprenant, A., North, R.A. 1989. 5-HT3 receptors are membrane ion channels. *Nature* 339, 706-709.

Dickson, E.J., Heredia, D.J., Smith, T.K. 2010. Critical role of 5-HT1A, 5-HT3, and 5-HT7 receptor subtypes in the initiation, generation, and propagation of the murine colonic migrating motor complex. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 299, G144-157.

Doyle, D.A. 2004. Structural changes during ion channel gating. *Trends in neurosciences* 27, 298-302.

Erkkila, B.E., Weiss, D.S., Wotring, V.E. 2004. Picrotoxin-mediated antagonism of alpha3beta4 and alpha7 acetylcholine receptors. *Neuroreport* 15, 1969-1973.

Evans, R.J. 2010. Structural interpretation of P2X receptor mutagenesis studies on drug action. *British journal of pharmacology* 161, 961-971.

Fargeas, M.J., Fioramonti, J., Bueno, L. 1988. Central and peripheral action of GABAA and GABAB agonists on small intestine motility in rats. *European journal of pharmacology* 150, 163-169.

Fenster, C.P., Beckman, M.L., Parker, J.C., Sheffield, E.B., Whitworth, T.L., Quick, M.W., Lester, R.A. 1999. Regulation of alpha4beta2 nicotinic receptor

desensitization by calcium and protein kinase C. *Molecular pharmacology* 55, 432-443.

Foreman, J.C., Johansen, T. 2003. *Textbook of Receptor Pharmacology* CRC Press.

Furness, J.B. 2012. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 9, 286-294.

Galligan, J.J. 1998. Mechanisms of excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *Tokai J Exp Clin Med*, 23, 129-36.

Galligan, J.J. 2002a. Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 14, 611-623.

Galligan, J.J. 2002b. Pharmacology of synaptic transmission in the enteric nervous system. *Curr Opin Pharmacol* 2, 623-629.

Glushakov, A.V., Voytenko, L.P., Skok, M.V., Skok, V. 2004. Distribution of neuronal nicotinic acetylcholine receptors containing different alpha-subunits in the submucosal plexus of the guinea-pig. *Auton Neurosci* 110, 19-26.

Goodin, S., Cunningham, R. 2002. 5-HT(3)-receptor antagonists for the treatment of nausea and vomiting: a reappraisal of their side-effect profile. *The oncologist* 7, 424-436.

Goutelle, S., Maurin, M., Rougier, F., Barbaut, X., Bourguignon, L., Ducher, M., Maire, P. 2008. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundamental & clinical pharmacology* 22, 633-648.

Goyal, R.K., Hirano, I. 1996. The enteric nervous system. *N Engl J Med* 334, 1106-1115.

Guerlet, G., Taly, A., Prado de Carvalho, L., Martz, A., Jiang, R., Specht, A., Le Novere, N., Grutter, T. 2008. Comparative models of P2X2 receptor support inter-subunit ATP-binding sites. *Biochemical and biophysical research communications* 375, 405-409.

Gum, R., J, Wakefield, B., Jarvis, M., F. 2012. P2X receptor antagonists for pain management: examination of binding and physicochemical properties. *Purinergic Singnalling* 8, S41-S56.

Hales, T.G., Dunlop, J.I., Deeb, T.Z., Carland, J.E., Kelley, S.P., Lambert, J.J., Peters, J.A. 2006. Common determinants of single channel conductance within the large cytoplasmic loop of 5-hydroxytryptamine type 3 and alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of biological chemistry* 281, 8062-8071.

Hamrouni, A.M., Gudka, N., Broadley, K.J. 2006. Investigation of the mechanism for the relaxation of rat duodenum mediated via M1 muscarinic receptors. *Auton Autacoid Pharmacol* 26, 275-284.

Hansen, M.B. 2003. The enteric nervous system III: a target for pharmacological treatment. *Pharmacol Toxicol* 93, 1-13.

Hilmas, C., Pereira, E.F., Alkondon, M., Rassoulpour, A., Schwarcz, R., Albuquerque, E.X. 2001. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 7463-7473.

Hill, A.V. 1909. The mode of action of nicotine and curari, determined by the form of the contraction curve and the method of temperature coefficients. *The Journal of physiology* 39, 361-373.

Hill, A.V. 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *Journal of Physiology* 40, iv–vii.

Hille, B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes* Sinauer.

Hryhorov, O.O., Skok, M.V., Skok, V.I. 2004. [Alfa-subunit composition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors of the submucosal plexus in the guinea-pig small intestine]. *Fiziol Zh* 50, 73-78.

Jeanclos, E.M., Lin, L., Treuil, M.W., Rao, J., DeCoster, M.A., Anand, R. 2001. The chaperone protein 14-3-3eta interacts with the nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit. Evidence for a dynamic role in subunit stabilization. *The Journal of biological chemistry* 276, 28281-28290.

Kadowaki, M., Wade, P.R., Gershon, M.D. 1996. Participation of 5-HT₃, 5-HT₄, and nicotinic receptors in the peristaltic reflex of guinea pig distal colon. *The American journal of physiology* 271, G849-857.

Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T. 2000. *Principles of Neural Science*, Fourth Edition McGraw-Hill Companies, Incorporated.

Katz, B. 1978. Archibald Vivian Hill. 26 September 1886-3 June 1977. *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society* 24, 71-149.

Kawate, T., Michel, J.C., Birdsong, W.T., Gouaux, E. 2009. Crystal structure of the ATP-gated P2X₄ ion channel in the closed state. *Nature* 460, 592-598.

Kelley, S.P., Dunlop, J.I., Kirkness, E.F., Lambert, J.J., Peters, J.A. 2003. A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors. *Nature* 424, 321-324.

Kenakin, T. 2004. Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends in pharmacological sciences* 25, 186-192.

Khakh, B.S. 2001. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci* 2, 165-174.

Khakh, B.S., North, R.A. 2006. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442, 527-532.

Kim, M., Jiang, L.H., Wilson, H.L., North, R.A., Surprenant, A. 2001. Proteomic and functional evidence for a P2X₇ receptor signalling complex. *The EMBO journal* 20, 6347-6358.

Knapp, R.J., Malatynska, E., Yamamura, H.I. 1990. From binding studies to the molecular biology of GABA receptors. *Neurochemical research* 15, 105-112.

Lester, H.A., Dibas, M.I., Dahan, D.S., Leite, J.F., Dougherty, D.A. 2004. Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends in neurosciences* 27, 329-336.

Letinic, K., Zoncu, R., Rakic, P. 2002. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 417, 645-649.

Levitan, I.B., Kaczmarek, L.K. 2001. *The Neuron : Cell and Molecular Biology: Cell and Molecular Biology* Oxford University Press, USA.

Maehle, A.H., Prull, C.R., Halliwell, R.F. 2002. The emergence of the drug receptor theory. *Nature reviews. Drug discovery* 1, 637-641.

Marder, E., Paupardin-Tritsch, D. 1980. Picrotoxin block of a depolarizing ACh response. *Brain research* 181, 223-227.

Margeta, M.A., Shen, K., Grill, B. 2008. Building a synapse: lessons on synaptic specificity and presynaptic assembly from the nematode *C. elegans*. *Current opinion in neurobiology* 18, 69-76.

Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Unwin, N. 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423, 949-955.

Monro, R.L., Bertrand, P.P., Bornstein, J.C. 2002. ATP and 5-HT are the principal neurotransmitters in the descending excitatory reflex pathway of the guinea-pig ileum. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 14, 255-264.

Mu, T.W., Lester, H.A., Dougherty, D.A. 2003. Different binding orientations for the same agonist at homologous receptors: a lock and key or a simple wedge? *Journal of the American Chemical Society* 125, 6850-6851.

Nakajima, K., Tooyama, I., Kuriyama, K., Kimura, H. 1996. Immunohistochemical demonstration of GABAB receptors in the rat gastrointestinal tract. *Neurochemical research* 21, 211-215.

Neunlist, M., Michel, K., Reiche, D., Dobрева, G., Huber, K., Schemann, M. 2001. Glycine activates myenteric neurones in adult guinea-pigs. *The Journal of physiology* 536, 727-739.

North, R.A. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews* 82, 1013-1067.

Olsen, R.W., Sieghart, W. 2009. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56, 141-148.

Owens, D.F., Boyce, L.H., Davis, M.B., Kriegstein, A.R. 1996. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 6414-6423.

Paul, M., Callahan, R., Au, J., Kindler, C.H., Yost, C.S. 2005. Antiemetics of the 5-hydroxytryptamine 3A antagonist class inhibit muscle nicotinic acetylcholine receptors. *Anesth Analg* 101, 715-721, table of contents.

Paula-Lima, A.C., Louzada, P.R., De Mello, F.G., Ferreira, S.T. 2003. Neuroprotection against Abeta and glutamate toxicity by melatonin: are GABA receptors involved? *Neurotox Res* 5, 323-327.

Pollock, V.V., Pastoor, T.E., Wecker, L. 2007. Cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) phosphorylates Ser362 and 467 and protein kinase C phosphorylates Ser550 within the M3/M4 cytoplasmic domain of human nicotinic receptor alpha4 subunits. *Journal of neurochemistry* 103, 456-466.

Purves, D., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., Lamantia, A.S., McNamara, J.O., Williams, S.M., Augustine, G.J. 2001. *Neuroscience* Sinauer Associates.

Reis, H.J., Vanden Berghe, P., Romano-Silva, M.A., Smith, T.K. 2006. GABA-induced calcium signaling in cultured enteric neurons is reinforced by activation of cholinergic pathways. *Neuroscience* 139, 485-494.

Roerig, B., Nelson, D.A., Katz, L.C. 1997. Fast synaptic signaling by nicotinic acetylcholine and serotonin 5-HT3 receptors in developing visual cortex. *The*

Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 17, 8353-8362.

Sieghart, W. 2007. Subunit Composition and Structure of GABA_A-Receptor Subtypes. In: Enna, S.J., Möhler, H., (Eds.), The GABA Receptors. Humana Press. pp. 69-86.

Simonds, W.F., DeGroat, W.C. 1980. Antagonism by picrotoxin of 5-hydroxytryptamine-induced excitation of primary afferent neurons. Brain research 192, 592-591.

Sun, H., Hu, X.Q., Moradel, E.M., Weight, F.F., Zhang, L. 2003. Modulation of 5-HT₃ receptor-mediated response and trafficking by activation of protein kinase C. The Journal of biological chemistry 278, 34150-34157.

Sun, H., Machu, T.K. 2000. Bicuculline antagonizes 5-HT_{3A} and alpha2 glycine receptors expressed in Xenopus oocytes. European journal of pharmacology 391, 243-249.

Tasneem, A., Iyer, L.M., Jakobsson, E., Aravind, L. 2005. Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. Genome biology 6, R4.

Thompson, A., Lummis, S. 2013. Discriminating between 5-HT₃ A and 5-HT₃ AB receptors. British journal of pharmacology 169, 736-747.

Thompson, A.J., Lester, H.A., Lummis, S.C. 2010. The structural basis of function in Cys-loop receptors. Quarterly reviews of biophysics 43, 449-499.

Tsetlin, V., Kuzmin, D., Kasheverov, I. 2011. Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors. Journal of neurochemistry 116, 734-741.

Unwin, N. 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol* 346, 967-989.

Vial, C., Roberts, J.A., Evans, R.J. 2004a. Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends in pharmacological sciences* 25, 487-493.

Vial, C., Tobin, A.B., Evans, R.J. 2004b. G-protein-coupled receptor regulation of P2X1 receptors does not involve direct channel phosphorylation. *The Biochemical journal* 382, 101-110.

Wu, F.S., Yang, Y.C., Tsai, J.J. 1999. Melatonin potentiates the GABA(A) receptor-mediated current in cultured chick spinal cord neurons. *Neuroscience letters* 260, 177-180.

Yang, N., Liu, S.M., Zheng, L.F., Ji, T., Li, Y., Mi, X.L., Xue, H., Ren, W., Xu, J.D., Zhang, X.H., Li, L.S., Zhang, Y., Zhu, J.X. 2010. Activation of submucosal 5-HT(3) receptors elicits a somatostatin-dependent inhibition of ion secretion in rat colon. *British journal of pharmacology* 159, 1623-1625.

Young, M.T. 2010. P2X receptors: dawn of the post-structure era. *Trends in biochemical sciences* 35, 83-90.

Zhou, X., Ren, J., Brown, E., Schneider, D., Caraballo-Lopez, Y., Galligan, J.J. 2002. Pharmacological properties of nicotinic acetylcholine receptors expressed by guinea pig small intestinal myenteric neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 302, 889-897.

CAPÍTULO 6

ANEXOS

ANEXO 1

6.1 Efecto de la melatonina sobre receptores ionotrópicos nativos de neuronas mientéricas de cobayo

La melatonina inhibió las corrientes inducidas por la ACh y el GABA, en dependencia de la concentración (Fig. 13A). Las corrientes inducidas por el ATP y la 5-HT no se vieron afectadas a una concentración de melatonina de 0.5 mM (Fig. 14). Construimos una curva concentración respuesta de la inhibición de la melatonina sobre las corrientes inducidas por la ACh y arrojó una IC_{50} de 82 μ M y un coeficiente de Hill de 0.82 ± 0.07 (Fig. 13B). Por otro lado, las corrientes inducidas por GABA (0.3 mM) fueron inhibidas un 21% respecto al control, por melatonina (0.5 mM). Debido a la alta concentración de dimetil-sulfóxido, necesaria para disolver la melatonina, no fue posible hacer una curva concentración respuesta sobre las I_{GABA} .

La inhibición inducida por la melatonina sobre las corrientes inducidas por la ACh fue mostrada por primera vez en neuronas del plexo submucoso del cobayo (Barajas-Lopez et al., 1996b); la melatonina es más potente en neuronas mientéricas, IC_{50} de 82 μ M, que en neuronas submucosas, IC_{50} de 257 μ M. Esta

diferencia en las sensibilidades podría deberse a una diferencia en la composición de subunidades de los receptores nicotínicos de neuronas mientéricas y submucosas, incluso a una estequiometría diferente. En ambos plexos se han encontrado las subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 5$, usando inmunohistoquímica, pero la subunidad $\alpha 7$ sólo ha sido encontrada en el plexo submucoso (Glushakov et al., 2004; Hryhorov et al., 2004; Zhou et al., 2002). Adicionalmente, en el plexo mientérico de cobayo han sido reportadas las subunidades $\beta 2$ y $\beta 4$ (Zhou et al., 2002), sin embargo no hay reportes sobre las subunidades β en el plexo submucoso. Esta evidencia parece indicar que la presencia de la subunidad $\alpha 7$ en los receptores nicotínicos del plexo submucoso, es la responsable por las diferentes IC_{50} s, pero no podemos descartar el posible papel de las subunidades β en la sensibilidad de la melatonina.

Además, nosotros reportamos el efecto inhibitorio de la melatonina sobre los receptores $GABA_A$ en las neuronas mientéricas de cobayo; este es el primer reporte de la inhibición por la melatonina en mamíferos. No obstante, se ha reportado que la melatonina a una concentración de 1 mM potencia las corrientes inducidas por GABA (Wu et al., 1999), además se ha reportado a la melatonina como un anticonvulsivo y fue propuesta como un neuroprotector, ya que disminuye el tono excitatorio mediado, al menos en parte, por los receptores $GABA_A$ (Albertson et al., 1981; Paula-Lima et al., 2003). El efecto opuesto de la melatonina sobre los receptores $GABA_A$ de neuronas mientéricas, podría explicarse por las diferentes subunidades que componen a los receptores $GABA_A$ en el sistema nervioso entérico y el sistema nervioso central. Hay reportes de la

presencia de las subunidades $\alpha_{1, 3-6}$, β_{2-3} y $\gamma_{1, 3}$, pero no de las subunidades α_2 , β_1 , γ_2 y δ ; la diferencia principal con el sistema nervioso central es que este también expresa las subunidades α_2 , β_1 , γ_2 y δ (Olsen et al., 2009; Sieghart, 2007), por lo tanto el efecto inhibitorio de la melatonina en las neuronas mientéricas pudiera ser explicado por la diferente composición de subunidades que podrían estar formando el receptor GABA_A.

Finalmente, la melatonina podría tener un papel de neuro-modulador negativo o positivo dependiendo del sitio donde sea liberada; en el sistema nervioso central es modulador positivo y en el sistema nervioso entérico modulador negativo.

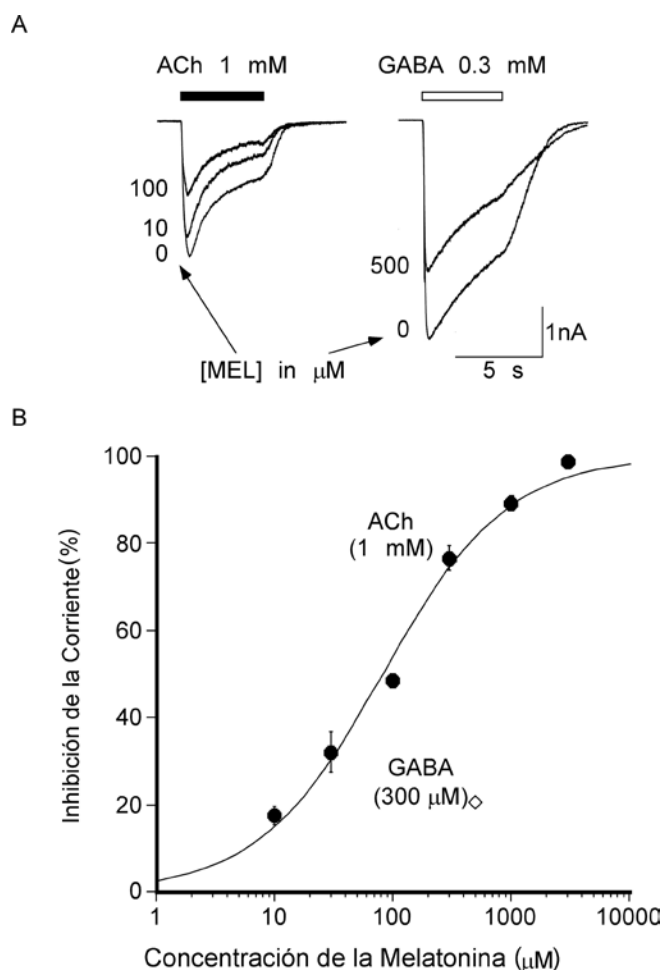


Figura 13. La melatonina inhibe las corrientes inducidas por la ACh y el GABA. A) Las corrientes inducidas por la ACh 1 mM (barra negra) y el GABA 0.3 mM (barra blanca) fueron inhibidas por la melatonina a las concentraciones señaladas ($n=4-7$). La inhibición sobre las corrientes inducidas por la ACh fue dependiente de la concentración. Las corrientes inducidas por el GABA se inhibieron el 21% por la presencia de la melatonina 500 μM , no fue posible usar concentraciones superiores, dada la citotoxicidad del dimetil sulfóxido, el vehículo para solubilizar la melatonina. La inhibición de la melatonina sobre las corrientes inducidas por la ACh y el GABA fue reversible. Las corrientes inducidas por los agonistas fueron registradas en presencia y ausencia de la melatonina, a las condiciones señaladas, en la misma neurona mientérica. B) Curva concentración respuesta de la inhibición sobre las corrientes inducidas por la ACh, la respuesta es expresada como porcentaje de la inhibición sobre la corriente inducida por el agonista. La IC_{50} fue $82 \pm 9 \mu\text{M}$ y un coeficiente de Hill de 0.8 ± 0.07 . La inhibición sobre las corrientes inducidas por el GABA está representada con un solo punto, Las líneas sobre los símbolos son los E.E.M. Los registros se hicieron en neuronas mientéricas de cobayo a un voltaje fijo de -60 mV.

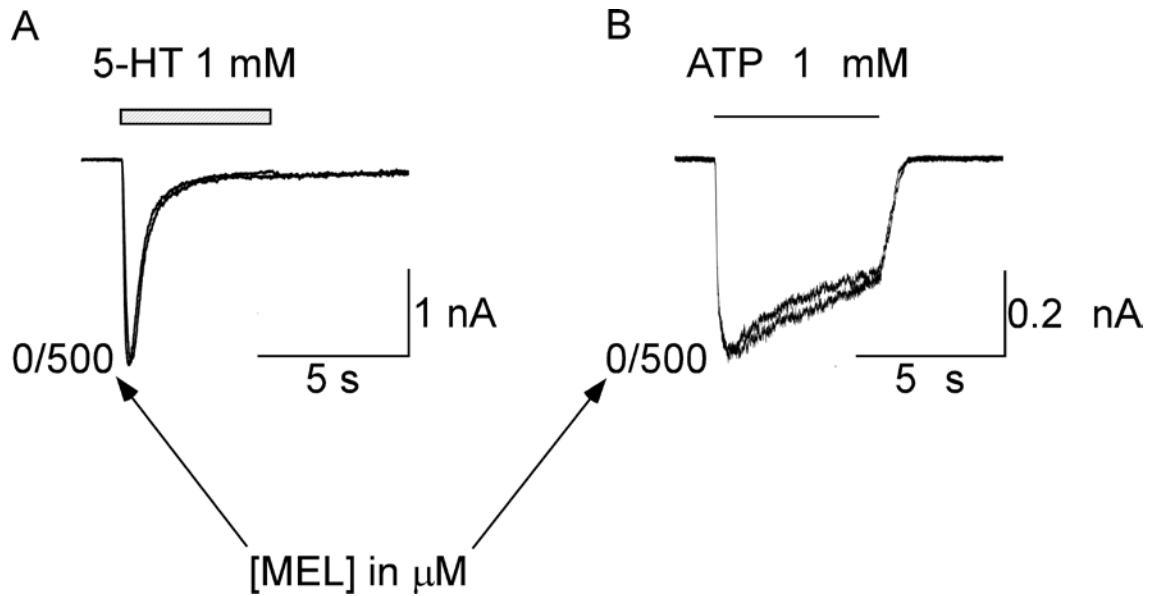


Figura 14. La melatonina no inhibe las corrientes inducidas por el ATP y la 5-HT. Las corrientes inducidas por (A) 5-HT (barra gris) y (B) ATP (línea negra) ambos agonistas a una concentración de 1 mM, en presencia de melatonina 500 μ M ($n=3-6$). Las corrientes inducidas por los agonistas fueron registradas en presencia y ausencia de la melatonina en la misma neurona mientérica. Los registros se hicieron en neuronas mientéricas de cobayo a un voltaje de -60 mV.

ANEXO 2

6.2 Selectivity of antagonists for the Cys-loop Native Receptors for ach, 5-HT and GABA in Guinea-Pig Myenteric Neurons

This is the pre-peer reviewed version of the following article: Juarez EH, Ochoa-Cortez F, Miranda-Morales M, Espinosa-Luna R, Montano LM, Barajas-Lopez C. Selectivity of antagonists for the Cys-loop native receptors for ACh, 5-HT and GABA in guinea-pig myenteric neurons. Auton Autacoid Pharmacol. 2014 Jan-Mar;34(1-2):1-8, which has been published in final form at <http://doi.org/10.1111/aap.12016> This article may be used for non-commercial purposes in accordance with Wiley Terms and Conditions for Self-Archiving

Selectivity of antagonists for the *Cys-loop* Native Receptors for ACh, 5-HT and GABA in Guinea-Pig Myenteric Neurons

Esri H. Juárez¹, Fernando Ochoa-Cortés¹, Marcela Miranda-Morales², Rosa Espinosa-Luna¹, Luis M. Montaña³, & Carlos Barajas-López^{1*}

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

²Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, Querétaro, México

³Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México

Summary

1. The three most common *Cys-loop* receptors expressed by myenteric neurons are nACh, 5-HT₃, and GABA_A. To investigate the function of these proteins researchers have used channel inhibitors such as hexamethonium (antagonist of nACh receptors), ondansetron (antagonist of 5-HT₃ receptors), picrotoxin, and bicuculline (both antagonists of GABA_A receptors). The aim of the present study was to investigate the specificity of these inhibitors on *Cys-loop* receptors of primary cultured neurons obtained from the guinea-pig small intestine. The whole cell configuration of the patch clamp techniques was used to record membrane currents induced by ACh (I_{ACh}), 5-HT (I_{5-HT}) and GABA (I_{GABA}) in the absence and the presence of various concentrations of hexamethonium, ondansetron, picrotoxin, or bicuculline.

2. The three *Cys-loop* receptors present in enteric neurons are expressed independently and they do not cross-desensitized. Hexamethonium inhibited I_{ACh} without affecting I_{5-HT} and I_{GABA}. Ondansetron inhibited I_{5-HT} and also I_{ACh} but did not affect I_{GABA}. Picrotoxin and bicuculline inhibited I_{5-HT}, I_{ACh} and I_{GABA} with different potency, being the lowest potency on 5-HT₃ receptors. All these inhibitory effects were concentration dependent and reversible.

3. Our observations showed that except for hexamethonium, all other inhibitors used here show different degrees of selectivity, which has to be considered when these antagonists are used in experimental studies aimed to investigate the functions of these receptors. In particular, in tissues expressing nACh receptors because these are the targets of all other inhibitors used here. The low potency of picrotoxin and bicuculline to inhibit 5-HT₃ receptors suggest that these receptors are heteromeric proteins.

Keywords: GABA_A receptors, 5-HT₃ receptors, nACh receptors, enteric nervous system, ligand-gated ion channels.

Introduction

Three *Cys-loop* receptors are the most commonly expressed in myenteric neurons, which are activated by ACh, (nACh receptors), 5-Hydroxytryptamine (5-HT₃ receptors), or γ -aminobutyric acid (GABA_A receptors) (Miranda-Morales, *et al.*, 2007, Zhou & Galligan, 1999, Zhou & Galligan, 2000, Zhou, *et al.*, 2002). Nicotinic receptors are broadly involved as mediators of fast

excitatory postsynaptic potentials (Nishi & North, 1973) whereas, 5-HT₃ receptors appear to play a similar role in about 11% of neurons (Galligan, *et al.*, 2000). 5-HT₃ receptors are also involved in the descending reflex and regulate the duration of the peristaltic contractions (Monro, *et al.*, 2002). The function of GABA_A receptors in the myenteric plexus where first described by the group of north (Cherubini & North, 1984) and

until now it is a matter of discussion (Galligan, 2002, Krantis, 2000, Reis, *et al.*, 2006).

Cys-loop receptors antagonists like hexamethonium, ondansetron, picrotoxin and bicuculline have been used as tools for studying the properties and functions of these receptors (Galligan, 2002, Galligan, 2002, Hamrouni, *et al.*, 2006, Reis, *et al.*, 2006). In general these antagonists have been considered specific on one subgroup of *Cys-loop* receptors: hexamethonium on nACh receptors, ondansetron on 5-HT₃ receptors, and picrotoxin and bicuculline on GABA_A receptors (Chebib & Johnston, 2000, Fargeas, *et al.*, 1988, Reis, *et al.*, 2006, Roerig, *et al.*, 1997). However, experimental evidence indicates that some of them might affect more than one subgroup of *Cys-loop* receptors. For instance, on neurons from the stomatogastric ganglion of the crab, picrotoxin also inhibits a postsynaptic depolarizing ACh response (Marder & Paupardin-Tritsch, 1980) and the rat recombinant nACh receptors (Erkkila, *et al.*, 2004). Furthermore, ondansetron also has inhibitory actions on nACh muscle receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes (Paul, *et al.*, 2005). In sensory and autonomic ganglia of cats, picrotoxin also inhibits the depolarizing actions of 5-HT (Simonds & DeGroat, 1980) as well as the murine recombinant 5-HT₃ receptors (Das, *et al.*, 2003).

Despite their importance, the specificity of these commonly used antagonists on native *Cys-loop* receptors on myenteric neurons has not been investigated. Therefore, our aim here was to characterize the inhibitory effects of hexamethonium, picrotoxin, ondansetron, and bicuculline on *Cys-loop* receptors of myenteric neurons from the guinea-pig small intestine. We found that hexamethonium specifically inhibited nACh receptors. Ondansetron, picrotoxin or bicuculline were not specific as they also inhibit nACh receptors. Picrotoxin and bicuculline showed a low potency to inhibit 5-HT₃ receptors indicating that these receptors are heteromeric proteins.

Methods

Myenteric plexus dissection and primary neuronal cultures

All procedures were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care Committee of the *Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica*. Young guinea pigs (150-200 g), either female or male, were euthanized by decapitation, and a segment of five centimeters of proximal jejunum was removed and 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, after opened longitudinally. The mucosa and submucosal layers of the intestinal segment were dissected before removing most of the circular muscle layer, leaving only the longitudinal layer with the myenteric plexus embedded with it.

The myenteric preparation was dissociated using a sequential treatment with two enzymatic solutions, described previously by Barajas-Lopez and coworkers (Barajas-Lopez, *et al.*, 1996), the first contained papain (0.01 mg/ml; activated with 0.4 mg/ml of L-cysteine) and the second, collagenase (1mg/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. Culturing was made into 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.

Electrophysiology

The currents were recorded by Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices), recorded and analyzed with Axoscope 9.0 (PC) and Axograph 4.0 (Macintosh software), respectively. To measure the currents induced by the neurotransmitters we used the whole cell patch clamp configuration and voltage clamp. Primary cultures were short-term (24-72 hours) to prevent space clamp problems, due to neurite growth. Patch clamp pipettes were made and had access resistances of 1-5 MΩ with the used solutions. All experiments were carried on at a holding potential of -60 mV and the series resistance was electronically compensated from 70 to 80 percent.

Solutions and drugs

Experiments were carried out in Cs⁺ to decreased activation of potassium channels during agonist applications. The external solution composition used to make the experiments is (in mM): CaCl₂•2H₂O 2, CsCl 3, glucose 11, HEPES 4.8, NaCl 160 and pH was adjusted to 7.3-7.4 with NaOH; the pipette solution was composed by (in mM): CsCl 150, EGTA 10, HEPES 5, NaCl 10, ATPMg 4.5, GTP 0.1 and pH was adjusted to 7.3-7.4 with CsOH. The recording chamber was continuously superfused with external solution at approximately 2 ml/min flow rate.

Experimental solutions were applied by using a multi-barrel application device that allows rapid changes between the control and experimental solutions. Neurons were constantly superfused by placing a barrel with control solution in front of the cell being recorded and the external application of experimental substances was achieved by changing the control solution barrel with other with the same solution plus the drug(s). The wash out of the drug(s) was achieved by returning the control solution barrel in front of the cell. The duration of every drug application was approximately for 5 seconds (s) by gravity, adjusting every change in the volume level to avoid any flow rate variation. Experiments were performed at room temperature (~23° C). To study the antagonist effect, we first applied the agonist and antagonist separately by ~5 s (controls), then we applied the agonist plus the antagonist (at increasing concentrations) and finally we repeated the controls; between agonist applications we waited at least 5 minutes to avoid receptor desensitization.

Hexamethonium was purchased from Research Biomedical Inc. (Natick, MA, USA). All other substances were obtained from Sigma (St. Louis, MO., USA).

Analyses of Data

Results were expressed as the mean ± S.E.M. Concentration-response curves obtained here were fitted using the Hill equation as follows:

$$y = I_{max} \frac{x^n}{EC_{50}^n + x^n}$$

Where y is I/I_{max} (I =response amplitude), I_{max} is the maximum response, EC_{50} is the half-maximal effective concentration, n is the slope factor (Hill coefficient), and x is the

substance concentration. For antagonists I_{max} was considered to be 100%.

Results

General properties of *Cys-loop* receptors of guinea-pig myenteric neurons

ACh application (1 mM) induced a fast inward current (I_{ACh}) of at least -200 pA in 84 % of a total of 64 neurons, these cells had an average current of -1314 ± 136 pA. The amplitude of I_{ACh} was plotted as a function of ACh concentration and these data were analyzed using a logistic model yielding an EC_{50} value of 51 μ M and a Hill coefficient value was 1.8 (Fig. 1).

Serotonin application (1 mM) also induced a fast inward current (I_{5-HT}) of at least -200 pA in 92 % of a total of 71 neurons, which had an average current of -1681 ± 120 pA in response to 1 mM. The EC_{50} value for serotonin was 51 μ M and the Hill coefficient value was 0.89 (Fig. 1).

Application of GABA (1 mM) also induced an inward current (I_{GABA}) equal or larger than -200 pA in 80% of a total of 80 neurons these cells had an average current of -2251 ± 227 pA. The EC_{50} and Hill coefficient was 123 μ M and 1.1, respectively (Fig. 1).

To investigate if expression of nACh, GABA_A and 5-HT₃ channels is interdependent, the amplitude of two currents were determined in the same group of neurons and values were plotted and fitted to a linear function (Fig 2A-C). We found a weak correlation between the amplitudes of these three currents indicating that these receptors are expressed independently of each other. Furthermore, cross-desensitization was not observed among nACh, 5-HT₃, and GABA_A receptors in myenteric neurons. Thus, activation for about 90 s of one channel, desensitized its receptor but had not effect on the current amplitude mediated by the other two channels (Fig 3A and 3B).

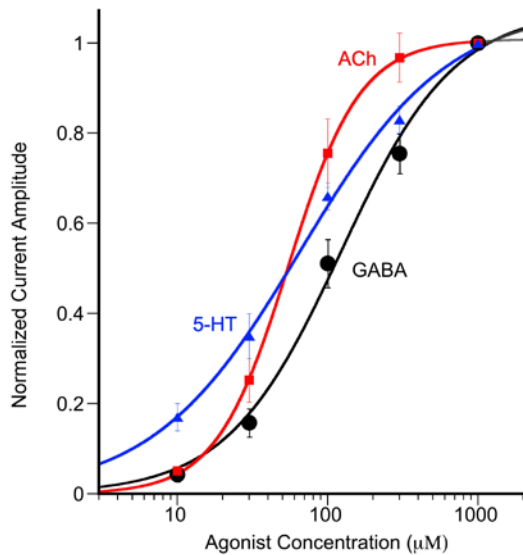


Figure 1. Concentration-response curves for endogenous agonists for *Cys-loop* receptors present in myenteric neurons. Whole-cell currents on myenteric neurons were induced by increasing concentrations (10-1000 μM) of ACh, 5-HT, and GABA. EC_{50} s had a value of 55, 66, and 123 μM , respectively. Currents were normalized considering the amplitude response to 1 mM as the unity. Symbols and lines represent the means ($n=4-12$) and S.E.M., respectively. Currents were recorded at a holding potential of -60 mV. Agonist application was done every 5 min to avoid receptor desensitization.

Effects of various antagonists on the *Cys-loop* receptors

Table 1 describes the estimated EC_{50} of the antagonists used in the present study on the *Cys loop* myenteric receptors.

Table 1. IC_{50} (in μM) of various antagonists of *Cys-loop* receptors.

Receptor	Antagonist	Hexamethonium	Ondansetron	Bicuculline	Picrotoxin
GABA _A	NE	NE	5.8	10	
nACh	11	3.9	15	55	
5-HT ₃	NE	0.05	191	444	

Each IC_{50} was calculated from concentration-response curves shown in Figs 4-7. NE, non-effect was observed.

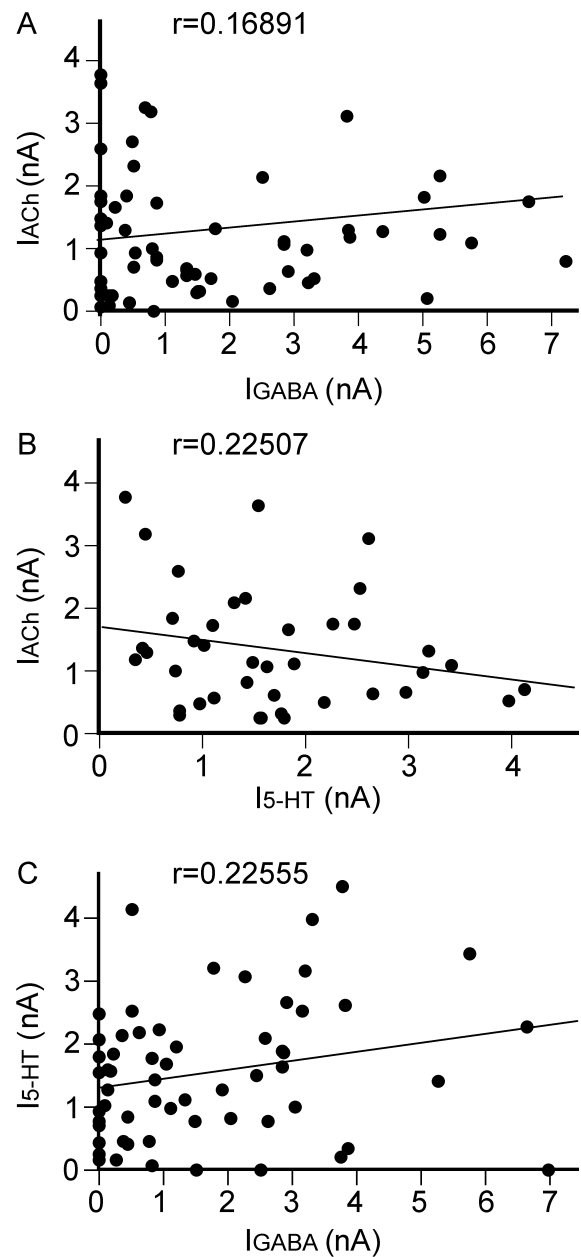


Figure 2. Nicotinic, 5-HT₃, and GABA_A receptors are expressed independently of each other. A) Currents induced by ACh versus those induced by GABA in the same myenteric neurons. B) Currents induced by ACh versus currents induced by 5-HT in the same myenteric neurons. C) Currents induced by 5-HT versus those induced by GABA in the same myenteric neuron. The absolute values of the correlation coefficients (r) are shown in each graph. The lines represent the best fitting to a linear function. Currents were obtained at holding potential of -60 mV in response to a 1 mM of agonist concentration and were always inward. Each symbol represents the current values of one myenteric neuron.

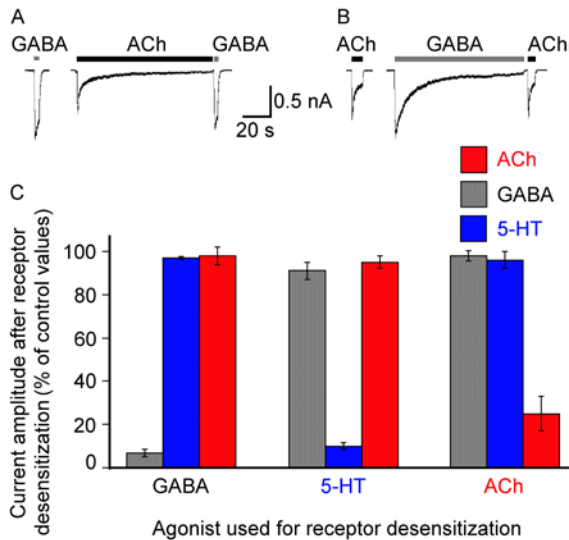


Figure 3. Activation of nACh, 5-HT₃, and GABA_A receptors desensitize specifically its own receptor. Current amplitude, in response to any of the three agonists, were measured before and after a long application (90 s) of ACh, GABA, or 5-HT. A) Current amplitude induced by GABA before (left trace) and after a long application of ACh. B) Current amplitude induced by ACh before (left trace) and after a long application of GABA. C) Bars and the lines on their top represent the means and S.E.M. of five experiments similar to those shown in A and B. All recordings were obtained at a holding potential of -60 mV and currents were induced with 1 mM agonist concentration.

Hexamethonium specifically inhibited nACh channels

Hexamethonium is frequently used to block cholinergic effects mediated by nACh receptors therefore, here we studied its effects on *Cys-loop* receptors present in myenteric neurons to determine its specificity. The current induced by ACh was inhibited in a concentration-dependent manner by hexamethonium (Fig. 4A), effect that was reverted after removing this inhibitor. The IC₅₀ and Hill coefficient were 11 μM and 0.79, respectively. Such an effect was specific on nACh receptors because hexamethonium did not affect the currents induced by GABA, or 5-HT, even at the concentration of 100 μM, which inhibited 90% of the I_{ACh} (Fig. 4B). The effects of hexamethonium were reverted by five minutes of wash.

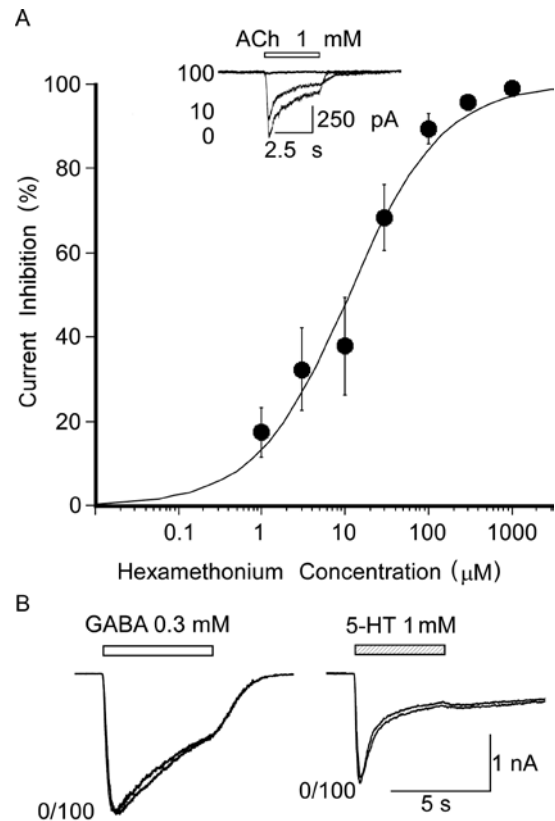


Figure 4. Hexamethonium (Hex) specifically inhibits nACh receptors in a concentration-dependent manner. A) Whole-cell currents were induced by ACh 1 mM at increasing concentrations of hexamethonium. The IC₅₀ for nACh receptors was 11 μM. Inset shows some typical recordings induced by ACh in the presence of various concentrations of hexamethonium, which are indicated by numbers beside recordings (in μM). Filled circles and the lines are means and S.E.M. (n=3-6) B) Currents induced by GABA and 5-HT before and in the presence of hexamethonium (100 μM), similar lack of effect was observed in four different myenteric neurons. Currents were obtained at a holding potential of -60 mV, and were always inward. Agonist applications were carried out every 5 min.

Bicuculline and picrotoxin inhibited the three *Cys-loop* receptors of myenteric neurons

Whole-cell currents induced by GABA, ACh, and 5-HT were all inhibited, in a reversible manner by bicuculline (Fig 5A). These effects were concentration-dependent with an estimated IC₅₀ of 5.8, 15, and 191 μM, and Hill coefficients of 1.04, 0.80 and 1.02, for GABA_A, nACh, and 5-HT₃ receptors, respectively (Fig. 5B). Concentrations of bicuculline ≤100 μM were used to avoid larger concentrations of its solvent (DMSO).

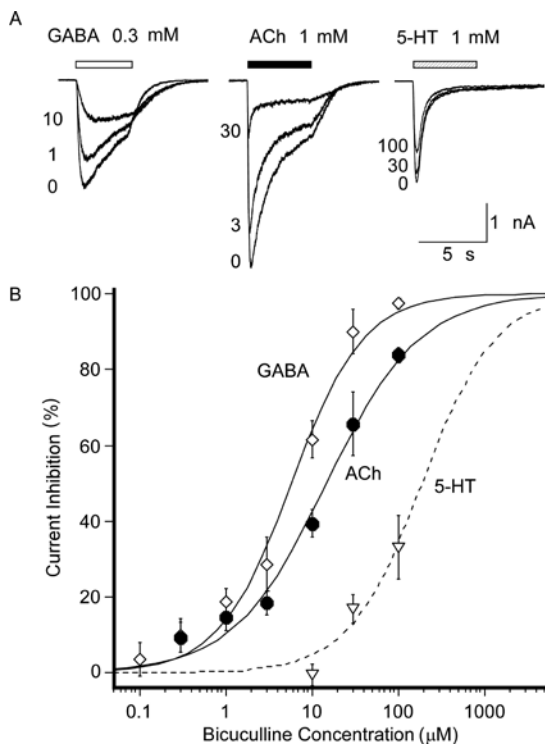


Figure 5. Bicuculline inhibits GABA_A, nACh, and 5-HT₃ receptors. A) Inward currents induced by GABA (0.3 mM), ACh (1 mM), and 5-HT (1 mM) were recorded before and in presence of different concentrations of bicuculline, which are indicated by numbers beside recordings (in μM). Currents of each panel were measured from a single myenteric neuron at a holding potential of -60 mV. B) Concentration-response curves for the inhibitory effects of bicuculline (0.1-100 μM) on the currents induced by GABA, ACh, and 5-HT ($n=3-13$). The estimated IC_{50} s for GABA_A, nACh, and 5HT₃ receptors are 5.8, 15, and 191 μM , respectively. Symbols and lines represent means and the S. E. M., respectively.

Picrotoxin had also an inhibitory effect on GABA_A, nACh, and 5-HT₃ receptors (Fig. 6A). This inhibitory effect was concentration-dependent (Fig. 6B) and the IC_{50} s were 10, 55, and 444 μM , respectively. The Hill coefficient values were 0.75, 0.86, and 1.2 respectively. The effects of bicuculline and picrotoxin were reversible after five minutes of wash.

Ondansetron inhibited only 5-HT₃ and nACh receptors

Ondansetron inhibited $I_{5\text{-HT}}$ and I_{ACh} (Fig. 7A) but had not effect on I_{GABA} at concentrations of 10 μM . The effect on $I_{5\text{-HT}}$ and I_{ACh} was concentration-dependent and reversible (Fig. 7B), with an IC_{50} of 0.05 and 3.9 μM and a Hill coefficient of 0.77 and 0.67. These effects were reversible after five minutes of wash.

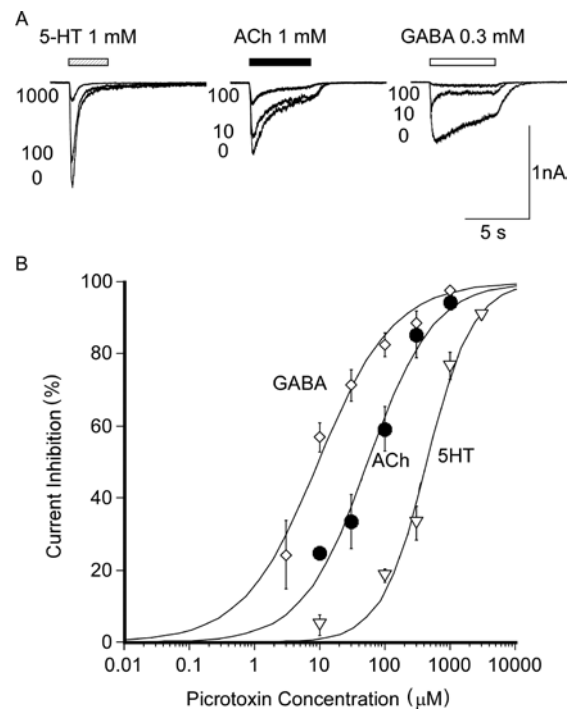


Figure 6. Picrotoxin inhibits GABA_A, nACh, and 5-HT₃ receptors. A) Inward currents induced by 5-HT (1 mM), ACh (1 mM), and GABA (0.3 mM) before and in presence of different concentrations of picrotoxin, which are indicated by numbers beside recordings (in μM). Currents shown in each panel were measured from the same myenteric neuron at a holding potential of -60 mV and were induced every 5 min. B) Concentration-response curve of the inhibitory effects of picrotoxin (3-3000 μM) on currents induced by GABA, ACh, and 5-HT, the IC_{50} s were 10, 55, and 444 μM , respectively ($n=3-5$). Symbols and lines represent the means and S. E. M., respectively.

Discussion

Our observations showed that, in myenteric neurons, the effect of ACh, GABA, and 5-HT is specific on nACh, GABA_A, and 5-HT₃ receptors, respectively despite the relative high concentrations used in the present study. Furthermore, except for hexamethonium, all other inhibitors used here are non specific. It is relevant the fact that nACh receptors, which play a central role in fast neurotransmission in the enteric nervous system, are inhibited for bicuculline, picrotoxin, and ondansetron. Our study implies that care must be taken when 5-HT₃ and GABA_A receptor antagonists are used in experimental protocols aimed to study the functions of such receptors because they could be acting on nACh receptors.

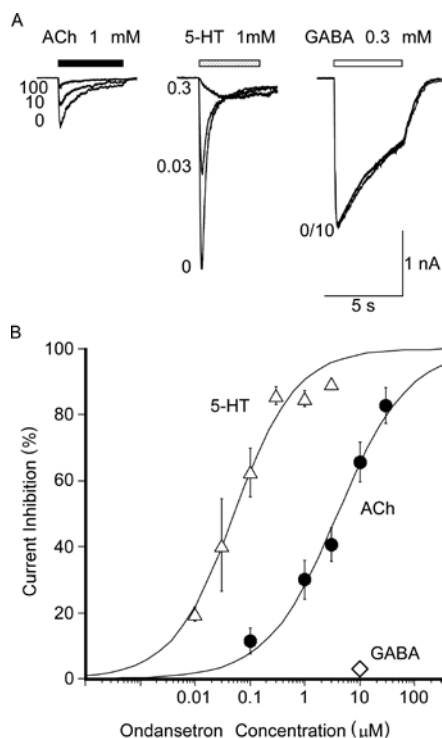


Figure 7. Ondansetron inhibits 5-HT- and ACh-induced currents but it does not affect GABA-induced currents. A) Whole-cell inwards currents induced by 5-HT (1 mM), ACh (1 mM), and GABA (0.3 mM) before and in presence of various concentrations of ondansetron, which are indicated by numbers beside recordings (in μM). Currents shown in each panel were measured from the same myenteric neuron at a holding potential of -60 mV the agonists were applied every 5 min. B) Concentration-response curves of the inhibitory effect of ondansetron (0.01-30 μM) on currents induced by 5-HT and ACh, the IC_{50} s are 0.05, and 4 μM , respectively ($n=4-10$). Symbols and the lines represent means and S. E. M., respectively.

It has been demonstrated that nACh, GABA_A, and 5-HT₃ receptors are constituted by a different set of proteins (Thompson, *et al.*, 2010), which are specifically activated by their endogenous agonists ACh, GABA, and 5-HT, respectively. On line with this, in myenteric neurons, these receptors are: i) expressed independently from each other; ii) desensitized through out independent mechanisms and iii) the three receptors have distinctive antagonist profile, as it is summarized in Table 1. Altogether, these results show that, in myenteric neurons, the effect of each three agonists is specific on only one Cys-loop receptor despite the relative high concentrations (0.3-1 mM) used here.

Nicotinic receptors are specifically blocked by hexamethonium but they are also

the target for ondansetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, and for bicuculline and picrotoxin, two GABA_A receptor antagonists. Indeed, ondansetron is about three times more potent than hexamethonium on nACh receptors. These findings are relevant because ondansetron, bicuculline, or picrotoxin, are often used to block 5-HT₃ or GABA_A receptors in preparations that also expressed nACh receptors (Alkondon, *et al.*, 1998, Dickson, *et al.*, 2010, Hilmas, *et al.*, 2001, Kadowaki, *et al.*, 1996, Monroe, *et al.*, 2002) and in some studies (Reis, *et al.*, 2006, Roerig, *et al.*, 1997) these antagonists are considered to be specific at concentrations that we showed can affect nACh receptors. Thus, in myenteric neurons, Reis *et al.* (2006) suggested that GABA (0.5-1 μM) is evoking a transient intracellular Ca^{2+} concentration increase by activation of GABA_A receptors because these transients were inhibited by 10 μM bicuculline. Based on our data it is unlikely that GABA_A receptors are being activated at the GABA concentrations used by these authors (0.5-1 μM) and we proposed that bicuculline might be acting by blocking nACh receptors. The latter hypothesis is supported by the fact that hexamethonium also inhibited the GABA-induced transients (Reis, *et al.*, 2006).

In mammals, 5-HT₃ receptors are formed by a combination of up to five different subunits, named 5-HT_{3A-E} (Thompson, 2013). Additional receptor heterogeneity is obtained through alternative splicing. Thus, two variants have been reported for 5-HT_{3A}, a short and a long one. Co expression of the 5-HT_{3A} and 5-HT_{3B} subunits results in heteromeric channels with a similar high single channel conductance seen in some populations of native receptors in the peripheral nervous system. Various studies have reported that picrotoxin (Das, *et al.*, 2003) and bicuculline (Sun & Machu, 2000) inhibit 5-HT_{3A} receptors, in a non-competitive and in a competitive fashion, respectively. Co expression of 5-HT_{3B} with 5-HT_{3A} subunits decrease 100 folds the picrotoxin potency (Das & Dillon, 2003) and at least for some species co expression also decrease the sensitivity to 5-HT (Thompson, 2013). Thus, picrotoxin has a useful selectivity between homomeric and heteromeric 5-HT₃ receptors. Several of our observations indicate that 5-HT₃ receptors of myenteric neurons are

heteromeric, for instance their low sensitivity to 5-HT (5-HT_{3A} receptors have EC₅₀ lower than 2 μM far lower than the myenteric 5-HT₃, (Das & Dillon, 2003, Thompson, 2013) and picrotoxin. In agreement with our interpretation, 5-HT₃ single channels with conductances of 15 and 9 pS have been recorded in enteric neurons (Derkach, *et al.*, 1989) whereas, 5-HT_{3A} channel conductance has been estimated to be around 0.4 pS but when the B-subunit is introduced, the channel conductance rises to 16 pS (Kelley, *et al.*, 2003). Therefore, heteromeric 5-HT₃ channels likely mediated the macroscopic currents recorded in myenteric neurons here.

In conclusion, hexamethonium is a highly selective antagonist of nACh receptors present in myenteric neurons and concentrations around 1 mM are required to block completely these channels, which is important to take into account when we want the complete inhibition of nACh receptors. Bicuculline and picrotoxin were more potent on GABA_A receptors and inhibit maximally I_{GABA} at concentrations of 0.1 and 1 mM, respectively. However, at these maximal concentrations also inhibited nACh and 5-HT₃ myenteric receptors. Ondansetron was the second antagonist with higher selectivity on Cys-loop myenteric receptors and inhibited maximally 5-HT₃ receptors at concentrations of 1 μM; this concentration also inhibited ~30% of the I_{ACh}, but not I_{GABA}. Therefore, these observations should be considered when 5-HT₃ and GABA_A receptor antagonists are used in experimental protocols aimed to study the functions of such receptors, in particular when single concentrations of these inhibitors are used and when nACh receptors are present in the experimental model because they are targets for all antagonists used here.

Acknowledgements

This work was supported by CONACYT, México (Project no. 48297). Scholarships of EHJ (204156) and FO-C (204411) were supported by CONACYT (México).

References

ALKONDON, M, PEREIRA, EF & ALBUQUERQUE, EX (1998). alpha-bungarotoxin- and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors

- mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices. *Brain Res*, **810**, 257-63.
- BARAJAS-LOPEZ, C, PERES, AL & ESPINOSA-LUNA, R (1996). Cellular mechanisms underlying adenosine actions on cholinergic transmission in enteric neurons. *Am J Physiol*, **271**, C264-75.
- CHEBIB, M & JOHNSTON, GA (2000). GABA-Activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *J Med Chem*, **43**, 1427-47.
- CHERUBINI, E & NORTH, RA (1984). Actions of gamma-aminobutyric acid on neurones of guinea-pig myenteric plexus. *Br J Pharmacol*, **82**, 93-100.
- DAS, P, BELL-HORNER, CL, MACHU, TK & DILLON, GH (2003). The GABA(A) receptor antagonist picrotoxin inhibits 5-hydroxytryptamine type 3A receptors. *Neuropharmacology*, **44**, 431-8.
- DAS, P & DILLON, GH (2003). The 5-HT_{3B} subunit confers reduced sensitivity to picrotoxin when co-expressed with the 5-HT_{3A} receptor. *Brain Res Mol Brain Res*, **119**, 207-12.
- DERKACH, V, SURPRENANT, A & NORTH, RA (1989). 5-HT₃ receptors are membrane ion channels. *Nature*, **339**, 706-9.
- DICKSON, EJ, HEREDIA, DJ & SMITH, TK (2010). Critical role of 5-HT_{1A}, 5-HT₃, and 5-HT₇ receptor subtypes in the initiation, generation, and propagation of the murine colonic migrating motor complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **299**, G144-57.
- ERKKILA, BE, WEISS, DS & WOTRING, VE (2004). Picrotoxin-mediated antagonism of alpha3beta4 and alpha7 acetylcholine receptors. *Neuroreport*, **15**, 1969-73.
- FARGEAS, MJ, FIORAMONTI, J & BUENO, L (1988). Central and peripheral action of GABAA and GABAB agonists on small intestine motility in rats. *Eur J Pharmacol*, **150**, 163-9.
- GALLIGAN, JJ (2002). Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, **14**, 611-23.
- GALLIGAN, JJ (2002). Pharmacology of synaptic transmission in the enteric nervous system. *Curr Opin Pharmacol*, **2**, 623-9.
- GALLIGAN, JJ, LEPARD, KJ, SCHNEIDER, DA & ZHOU, X (2000). Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst*, **81**, 97-103.
- HAMROUNI, AM, GUDKA, N & BROADLEY, KJ (2006). Investigation of the mechanism for the relaxation of rat duodenum mediated via M1 muscarinic receptors. *Auton Autacoid Pharmacol*, **26**, 275-84.
- HILMAS, C, PEREIRA, EF, ALKONDON, M, RASSOULPOUR, A, SCHWARCZ, R & ALBUQUERQUE, EX (2001). The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic

- receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci*, **21**, 7463-73.
- KADOWAKI, M, WADE, PR & GERSHON, MD (1996). Participation of 5-HT₃, 5-HT₄, and nicotinic receptors in the peristaltic reflex of guinea pig distal colon. *Am J Physiol*, **271**, G849-57.
- KELLEY, SP, DUNLOP, JI, KIRKNESS, EF, LAMBERT, JJ & PETERS, JA (2003). A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors. *Nature*, **424**, 321-4.
- KRANTIS, A (2000). GABA in the Mammalian Enteric Nervous System. *News Physiol Sci*, **15**, 284-290.
- MARDER, E & PAUPARDIN-TRITSCH, D (1980). Picrotoxin block of a depolarizing ACh response. *Brain Res*, **181**, 223-7.
- MIRANDA-MORALES, M, GARCIA-HERNANDEZ, LM, OCHOA-CORTES, F, ESPINOSA-LUNA, R, NARANJO-RODRIGUEZ, EB & BARAJAS-LOPEZ, C (2007). Cross-talking between 5-HT₃ and GABA_A receptors in cultured myenteric neurons. *Synapse*, **61**, 732-40.
- MONRO, RL, BERTRAND, PP & BORNSTEIN, JC (2002). ATP and 5-HT are the principal neurotransmitters in the descending excitatory reflex pathway of the guinea-pig ileum. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, **14**, 255-64.
- NISHI, S & NORTH, RA (1973). Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *J Physiol*, **231**, 471-91.
- PAUL, M, CALLAHAN, R, AU, J, KINDLER, CH & YOST, CS (2005). Antiemetics of the 5-hydroxytryptamine 3A antagonist class inhibit muscle nicotinic acetylcholine receptors. *Anesth Analg*, **101**, 715-21, table of contents.
- REIS, HJ, VANDEN BERGHE, P, ROMANO-SILVA, MA & SMITH, TK (2006). GABA-induced calcium signaling in cultured enteric neurons is reinforced by activation of cholinergic pathways. *Neuroscience*, **139**, 485-94.
- ROERIG, B, NELSON, DA & KATZ, LC (1997). Fast synaptic signaling by nicotinic acetylcholine and serotonin 5-HT₃ receptors in developing visual cortex. *J Neurosci*, **17**, 8353-62.
- SIMONDS, WF & DEGROAT, WC (1980). Antagonism by picrotoxin of 5-hydroxytryptamine-induced excitation of primary afferent neurons. *Brain Res*, **192**, 592-597.
- SUN, H & MACHU, TK (2000). Bicuculline antagonizes 5-HT(3A) and alpha2 glycine receptors expressed in Xenopus oocytes. *Eur J Pharmacol*, **391**, 243-9.
- THOMPSON, AJ (2013). Recent developments in 5-HT₃ receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, **34**, 100-9.
- THOMPSON, AJ, LESTER, HA & LUMMIS, SC (2010). The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Q Rev Biophys*, **43**, 449-99.
- ZHOU, X & GALLIGAN, JJ (1999). Synaptic activation and properties of 5-hydroxytryptamine(3) receptors in myenteric neurons of guinea pig intestine. *J Pharmacol Exp Ther*, **290**, 803-10.
- ZHOU, X & GALLIGAN, JJ (2000). GABA(A) receptors on calbindin-immunoreactive myenteric neurons of guinea pig intestine. *J Auton Nerv Syst*, **78**, 122-35.
- ZHOU, X, REN, J, BROWN, E, SCHNEIDER, D, CARABALLO-LOPEZ, Y & GALLIGAN, JJ (2002). Pharmacological properties of nicotinic acetylcholine receptors expressed by guinea pig small intestinal myenteric neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, **302**, 889-97.