



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE
LOS RECEPTORES-CANAL P2X Y GABA_A Y SU
DEPENDENCIA DE VOLTAJE

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

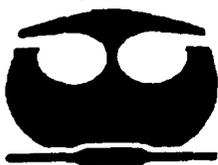
LUZ MARÍA GARCÍA HERNÁNDEZ

MÉXICO, D. F. 2002



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:

Profr: Rafael Ri3n Arriola

VOCAL:

Profra: Elia Brosla Naranjo Rodriguez

SECRETARIO:

Profr: Luis Ignacio Terrazas Vald3s

PRIMER SUPLENTE:

Profra: Maria Eva Gonz3lez Trujano

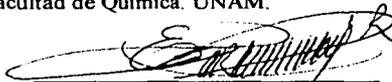
SEGUNDO SUPLENTE:

Profra: Rosa Ventura Martinez

Sitio de realizaci3n:

Laboratory of Synapse Physiology. Department of Anatomy and Cell Biology. *Queen's University Kingston, Ontario, Canada. Botterell Hall*, Floor nine, y en la Secci3n de Farmacologia, Departamento de Farmacia de la Facultad de Quimica. UNAM.

ASESOR:



Dra. Elia Brosla Naranjo Rodriguez

SUPERVISO T3CNICO:



Dr. Carlos Barajas L3pez

SUSTENTANTE:



Luz Maria Garcia Hernandez

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez por todo el apoyo, enseñanzas y consejos que me ha brindado antes, durante y después de la realización de ésta tesis.

Al Dr. Carlos Barajas López por todas las oportunidades que me ha dado y por enseñarme que el único camino es el trabajo duro.

A la técnica Rosa Espinosa Luna, por enseñarme un poco de lo mucho que sabe, por toda la paciencia que me tuvo siempre y por ser mas que una buena maestra, una buena amiga.

Gracias por el voto de confianza...

DEDICATORIAS

A mi mamá Sara por haberme aceptado en su vida, gracias por absolutamente todo.

A mi papá Daniel por todo su apoyo, comprensión y cariño.

A Paty por ser la mejor hermana del mundo.

A Alex por todo su apoyo y ayuda en todo, hasta en estadística.

Sin ustedes definitivamente no estaría aquí, gracias por todas sus enseñanzas y sacrificios. creo que ni en mil años podría terminar de agradecer y corresponder todo que han hecho por mí. Los quiero, gracias por su confianza.

A mis hermanos Daniel, José Manuel y Juan Carlos los quiero mucho aunque a veces estemos lejos, espero siempre nos ayudemos y estemos unidos.

A Pablo y Sofía, mis queridos sobrinos, espero que siempre estemos cerca sin importar la distancia.

A Sergio por toda la paciencia, ayuda, comprensión, cariño y paciencia (si otra vez) que siempre me ha brindado en todos estos años de conocernos.

A la Sra. Martina Montaña y al Sr. Alejandro Allier.

A Elsa Espinosa Páramo y Amparo Serrano Gómez por todos estos años de amistad y porque siempre, siempre han creído en mí.

A Alma Rosa porque a pesar del poco tiempo somos grandes amigas.

A mis amigos y compañeros de la facultad: Yeriley, Leticia, Leticia Berenice, Joel, Josefina, Jesús, Silvia Paola, Octavio, Mayté R., Iván, Diana, Rosa, Miguel, Raúl, Sandra, Pancho, Carlos... en fin, a todos con los que conviví en este bello tiempo de la Universidad.

A mis compañeros del laboratorio de Farmacología: Alfredo, Ruth, Alez, Marcela, Selene.

A mis compañeros en Queen's University: Rustum, Susanne, Nureen y Tanam.

A la familia Barajas Espinosa por abrirme las puertas de su casa.

A la familia Rodríguez Hernández por todo su apoyo.

A MHJ que siempre estas conmigo.

CAPÍTULO	PÁGINA
Abreviaturas	4
I.- Introducción	5
II.- Antecedentes	7
a. Sistema Nervioso	9
b. Importancia de los canales iónicos en la comunicación sináptica	10
c. Receptores canal	11
d. Receptores canal activados por GABA	12
e. Receptores purinérgicos	14
f. Cotransmisión e interacciones entre canales receptor	16
III.- Justificación de trabajo	19
IV.- Hipótesis y objetivos	21
V.- Material y Método	22
a. Material biológico	22
b. Equipo	22
c. Material	22
d. Reactivos	23
e. Técnica de Patch-Camp	24
f. Cultivo Celular	25
g. Método de disociación de neuronas de tejido mientérico de cobayo	26
h. Microelectrodo de registro	28
i. Registro de la corriente	28
VI.- Resultados	30
a. Propiedades generales de las corrientes de membrana inducidas por GABA y ATP	30
b. Las corrientes de membrana inducidas por GABA y ATP son oclusivas	35
c. Efecto del cambio de la dirección de corriente sobre la oclusión entre los canales GABA _A y P2X	36
VII.- Discusión	43
VIII.- Conclusión	46
IX.- Referencias bibliográficas	48

ABREVIATURAS

Abreviaciones

5-HT
5-HT₃
Ach
ADP
AMP
ATP
DA
GABA
NA
NACH
SN
SNA
SNC
SNE
TGI

Significado

Serotonina
Receptor a serotonina
Acetilcolina
Difosfato de Adenosina
Monofosfato de Adenosina
5'Trifosfato de Adenosina
Dopamina
Acido γ -aminobutírico
Noradrenalina
Receptor a acetilcolina nicotínico
Sistema nervioso
Sistema Nervioso Autónomo
Sistema Nervioso Central
Sistema Nervioso Entérico
Tracto gastrointestinal

1.-INTRODUCCION

Los receptores canal juegan un prominente papel en la transmisión inhibitora rápida en muchas sinápsis centrales y parecen ser el sitio de acción para fármacos de gran importancia en la terapéutica tales como benzodiazepinas, barbitúricos y neuroesteroides. El GABA es el transmisor inhibitor más importante en el Sistema Nervioso Central (SNC) y sus efectos son mediados en parte por los receptores ionotrópicos permeables al cloro(Cl^-) conocidos como receptores GABA_A . Los receptores que median la acción del 5'-Trifosfato de Adenosina (ATP) son los P2Y (metabotrópicos) y los P2X (ionotrópicos). Estos últimos están asociados a receptores canales permeables a cationes. Recientemente, se reportó que los receptores P2X y los canales abiertos por la acetilcolina (ACh), también conocidos como nicotínicos (nACh), pueden mantener interacciones alostéricas que inhiben la conductancia iónica de canales vecinos. Los receptores nACh, a pesar de que son permeables a cationes son estructuralmente parecidos a los canales GABA_A . Lo cual sugiere la **hipótesis** de que los canales GABA_A , podrían tener interacciones inhibitoras con los canales P2X con propiedades similares a las observadas entre los receptores P2X y nACh. Los **objetivos** específicos de esta tesis experimental son el corroborar la existencia de tales interacciones e investigar si éstas son bloqueadas cuando se modifica la dirección de las corrientes iónicas. La **estrategia experimental** consistió en la medición de las corrientes iónicas en membranas mientéricas de cobayo, generadas por la aplicación de concentraciones máximas de ATP y GABA y compararlas con las corrientes generadas por la aplicación simultánea de ambos agonistas. Experimentos similares se realizaron a distintos potenciales y a distintas concentraciones de Cl^- para determinar el efecto de la dirección del flujo de estos iones

sobre las interacciones inhibitorias de estos receptores. Las corrientes se midieron con la configuración de *whole-cell* de la técnica de *patch-clamp*. Nuestros resultados indican que hay una muy rápida interacción inhibitoria entre los canales GABA_A y P2X, la cual ocurre solamente para corrientes entrantes. Estas interacciones ocurren tan pronto como ocurre la activación de estos canales apoyando la hipótesis que los canales GABA_A y P2X están localizados muy cerca uno del otro en la membrana neuronal, quizás formando unidades funcionales constituidas por al menos un canal de cada tipo.

II.-ANTECEDENTES

Desde principios del siglo XIX se reconoce que los organismos están formados por elementos fundamentales: células. Sin embargo hasta el siglo XX es cuando los neurocientíficos coinciden en que el tejido nervioso al igual que los otros órganos está formado por esas unidades fundamentales [1, 2].

En la segunda mitad del siglo XIX, preveleían dos escuelas de investigadores, la de los reticulistas, quienes argumentaban que el sistema nervioso se encontraba formado por una continua e ininterrumpida red de fibras nerviosas y la otra escuela, la de los neuristas, quienes defendían que el sistema nervioso estaba formado por un gran número de simples unidades celulares interconectadas entre sí, las neuronas. Con el continuo desarrollo de la ciencia, la lucha entre ambas escuelas fue definida por la venida de una nueva técnica desarrollada por Camillo Golgi en 1880, la coloración de las fibras nerviosas bajo una reacción de dicromato de plata, permitiendo la visualización microscópica de la neurona completa, incluyendo el cuerpo celular y sus dos principales procesos celulares: las dendritas y el axón [1, 2]. Esta técnica fue empleada por el neuroanatomista español Santiago Ramón y Cajal en 1888, mostrando que el sistema nervioso es una intrincada red de células discretas y que la comunicación entre ellas era mediante conexiones especializadas que en 1897, Sherrington llamó sinapsis [1-3].

Dichos trabajos experimentales aportaron bastante del soporte empírico de la "doctrina neuronal", la cual desplazó a la reticulista. La doctrina neuronal establece que el tejido nervioso está formado por elementos celulares discretos, llamados neuronas y células gliales. Las neuronas son células altamente especializadas que han perdido su

capacidad reproductiva, mientras las células gliales tienen diversas funciones, algunas de ellas todavía desconocidas [1].

Las neuronas son células especializadas en la generación y el procesamiento de señales eléctricas para lo cual están organizadas en circuitos. La Figura 1 es una representación esquemática de una neurona multipolar, el tipo más común. La porción central de las neuronas se le conoce como cuerpo neuronal y contiene el núcleo y la mayor parte de los organelos celulares. Varios procesos nerviosos o extensiones nerviosas se desprenden del cuerpo neuronal. Uno de ellos es particularmente largo y mantiene su diámetro constante, el cual se le conoce como axón. Sólo hay un axón por neurona el cual sirve para llevar las señales eléctricas a otras células (por ejemplo neuronas, músculo, glándulas). Los otros procesos son más cortos y su diámetro disminuye conforme se alejan del cuerpo neuronal, estos procesos son conocidos como dendritas. La mayoría de las conexiones sinápticas, se establecen en las dendritas donde los axones de otras neuronas terminan. Desde el punto de vista funcional, las neuronas pueden clasificarse en sensoriales, interneuronas y motoras. Las primeras llevan información de la periferia hacia el sistema nervioso y su cuerpo neuronal se encuentra en ganglios sensoriales. Las neuronas motoras llevan información del sistema nervioso a los órganos efectores como los músculos, las glándulas, etc. Las interneuronas son células cuyos axones terminan dentro del mismo centro neuronal [1].

Las sinápsis pueden ser químicas o eléctricas. Las primeras usan sustancias (neurotransmisores), las cuales son liberadas en la terminal axónica para influenciar la membrana (postsináptica) de la célula receptora. En las sinápsis eléctricas, el citoplasma de las dos células se comunica mediante canales especializados, conocidos como uniones

comunicantes. Estas uniones tienen una baja resistencia eléctrica y permiten que las señales eléctricas de una neurona se propaguen a la segunda [1, 3].

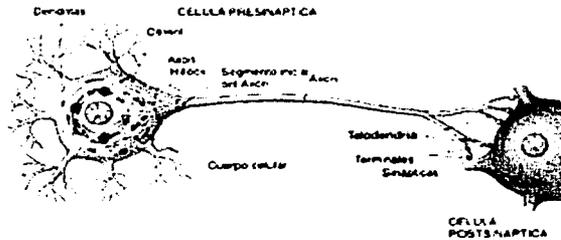


Figura 1. Representación esquemática de una neurona multipolar y su sinápsis [1].

a. Sistema Nervioso

La porción motora, eferente, del Sistema Nervioso Central (SNC) está formada por dos subdivisiones principales: autónoma y somática.

El Sistema Nervioso Autónomo (SNA) es en gran parte independiente, porque sus actividades no están bajo control consciente directo. Participa en funciones viscerales como gasto cardíaco, flujo sanguíneo a diversos órganos, digestión, etc. La división somática es en gran medida no autónoma y se encarga de funciones controladas conscientemente como movimiento, respiración y postura[1].

Además de las porciones motoras periféricas del SNA, existe abundancia de fibras aferentes que van de la periferia a los centros de integración, incluyendo los plexos entéricos en el intestino, los ganglios autónomos y el SNC. Muchas de las neuronas sensitivas que terminan en el SNC, lo hacen en los centros de integración del hipotálamo

y del bulbo raquídeo, y provocan actividad motora refleja que es transmitida a las células efectoras por las fibras eferentes.

El Sistema Nervioso Entérico (SNE) es un extenso y muy organizado grupo de neuronas situadas en las paredes del aparato digestivo. El SNE incluye el plexo mientérico (plexo de Auerbach) y el plexo submucoso (plexo de Meissner), estas redes neuronales reciben fibras preganglionares del sistema parasimpático, así como axones simpáticos post-ganglionares. También, reciben impulsos sensoriales del interior de la pared intestinal. Las fibras de los cuerpos en estos plexos se desplazan hasta el músculo liso del intestino para controlar la motilidad. El SNE inerva el tracto gastrointestinal, el páncreas y la vesícula biliar y además esta compuesto por neuronas sensoriales locales que registran alteraciones en la tensión de las paredes del intestino y del ambiente químico, así como de las interneuronas y neuronas motoras que controlan los músculos de la pared intestinal y vascular y también la actividad secretora de la mucosa. El SNE puede funcionar autónomamente, aunque su actividad esta normalmente regulada por reflejo del SNC. Por esto en el control del tono de los vasos sanguíneos gastrointestinales, motilidad, secreción gástrica y transporte de fluidos el SNE juega un importante papel en la homeostasis. [1].

b. Importancia de los Canales Iónicos en la Comunicación Sináptica

Las señales nerviosas se transmiten mediante potenciales de acción, que son cambios rápidos en el potencial de membrana [1, 2]. Cada potencial de acción comienza con un cambio brusco del potencial negativo normal de reposo a un potencial de membrana positivo y termina con una vuelta, casi igualmente rápida, al potencial

negativo. Para conducir una señal nerviosa, el potencial de acción se desplaza a lo largo de la fibra nerviosa hasta alcanzar el extremo de la misma.

La comunicación entre neuronas en el SNC se realiza mediante sinapsis químicas en la mayoría de los casos.

Las membranas de las células nerviosas contienen dos tipos de canales definidos en función de los mecanismos que controlan sus compuertas (apertura y cierre), el primer mecanismo es sensible al voltaje en la membrana; el segundo es activado químicamente. En las células nerviosas, estos canales están concentrados tanto en el segmento inicial como en el axón y son responsables del potencial de acción rápido, el cual transmite la señal desde el cuerpo celular hasta la terminal nerviosa. Existen muchos tipos de canales sensibles al voltaje en el cuerpo celular, dendritas y segmento inicial.

Los iones sodio(Na^+), potasio (K^+) y cloruro (Cl^-) son los más involucrados en la aparición de los potenciales de membrana de las fibras nerviosas y musculares; así como en las células nerviosas del SNC. El gradiente de concentración de cada uno de estos iones a través de la membrana ayuda a determinar el valor del potencial de membrana [1, 2].

c. Receptores Canal

Un gran número de fármacos que se utilizan en la medicina clínica actúan simulando o bloqueando las acciones de los ligandos endógenos que regulan el flujo de iones a través de la membrana plasmática. Los ligandos naturales incluyen acetilcolina (ACh), ácido γ -aminobutírico (GABA) y aminoácidos excitadores (glicina, aspartato y glutamato) siendo todos ellos agentes transmisores sinápticos. Por otro lado, las proteínas receptoras específicas a tales sustancias transmiten su señal, a través de la membrana

plasmática incrementando o disminuyendo la conductancia de la membrana neuronal de un ion o grupo de iones; modificando así, el potencial eléctrico y la resistencia de la membrana celular que se manifiestan en cambios de la excitabilidad neuronal.

Un potencial de acción en la fibra presináptica se propaga a la terminal sináptica y activa los canales de calcio (Ca^{2+}) sensibles al voltaje, en la membrana de la terminal. Estos canales permiten la entrada de iones calcio al interior de la terminal presináptica, lo cual induce la liberación del transmisor. Estos canales son en su mayoría de un subtipo llamado N [1-3].

Los receptores canal son activados de manera química. Estos son receptores que, se abren cuando los neurotransmisores u otros agentes químicos, se unen a la molécula receptora. La cual consiste en una proteína formada por subunidades y el canal es una parte integral de la misma. Los receptores canal se concentran en las membranas postsinápticas.

Los canales iónicos dependientes de voltaje, son los responsables de la generación de los potenciales de acción en el sistema nervioso. Los canales iónicos pueden encontrarse en dos estados, uno cerrado (no conductor) que no permite el paso de iones y, otro abierto (conductor), que permite el paso de iones en función de un gradiente electroquímico (de mayor a menor). Estos canales son sensibles a cambios en el potencial de membrana. Algunos se abren con la despolarización mientras que otros lo hacen con la hiperpolarización de la membrana.

d. Receptores Canal Activados por GABA

Los receptores GABA tienen una estructura similar a la de otros receptores ionotrópicos, por ejemplo los receptores canal activados por la ACh o glutamato, en el

sentido que todos ellos son proteínas formadas por aminoácidos. El número de subunidades de los distintos receptores canal es variable [2, 3].

Los receptores canal activados por GABA, pertenecen a la superfamilia de receptores nicotínicos [2-4], los cuales están compuestos por 5 subunidades cada una de las cuales posee características estructurales similares a las de los otros miembros de esta familia. Cada subunidad está compuesta de un amino terminal extracelular, seguido por 4 dominios transmembranales (M1-M4) y un carboxilo terminal también extracelular. Entre los dominios transmembranales hay un gran "bucle" intracelular el cual permite la interacción con la matriz intracelular.

El GABA es un neurotransmisor con acción inhibitoria, en el sentido que activa receptores que disminuyen la excitabilidad de la membrana postsináptica y disminuye la liberación de neurotransmisores activadores [2, 3]. Existen dos tipos de receptores importantes activados por el GABA, llamados GABA_A y GABA_B (aunque se conoce un tercer sitio de unión del GABA, los receptores GABA_C) [3].

. Los GABA_A son receptores canal permeables al cloro (Cl⁻), los cuales juegan un prominente papel en la transmisión sináptica rápida. Su activación genera hiperpolarizaciones de las neuronas postsinápticas llamados potenciales postsinápticos inhibidores.

Los receptores GABA_B son receptores metabotrópicos asociados a proteínas G y pueden afectar la excitabilidad neuronal mediante la generación de segundos mensajeros.

Las respuestas generadas por estos receptores son lentas. La activación de estos receptores puede inhibir la liberación de neurotransmisores en algunas sinápsis

excitadoras. Algunas sinapsis inhibitoras usan solamente un tipo de receptor activado por GABA, mientras que otras tienen ambos tipos [2-4].

En el SNC de los vertebrados los receptores $GABA_A$ poseen prominentes canales para la rápida corriente inhibitora postsináptica y tienen sitios de unión para fármacos como benzodiazepinas (el diazepam y clordiazepóxido que se unen a las subunidades α y β de los receptores $GABA_A$), barbitúricos (fenobarbital que es un sedante hipnótico se une a la subunidad γ de los mismos receptores) y neuroesteroides importantes en la terapéutica [2, 4]

El canal central de Cl^- de los receptores $GABA_A$ está formado por un arreglo heteropentamérico de subunidades polipeptídicas de tres familias α 1 a 6, β 1 a 4, γ 1 a 4, δ 1 a 3 [2-4]. Dentro de estas familias hay variantes adicionales, clases de un sólo miembro de subunidades: ϵ , θ y π también han sido identificadas. La subunidad δ solamente ha sido encontrada en la retina y son funcionalmente distintas por lo que se refiere a ellas como $GABA_C$.

En el cerebro de los vertebrados los receptores $GABA_{A2}$ se expresan en células de la corteza cerebral y del hipocampo, que incluyen las células piramidales que muestran mayor densidad de receptores $GABA_{A2}$ (subunidades $\alpha 2$) en el segmento inicial del axón, y presumiblemente controlan la producción de esas neuronas, así como en densidades postsinápticas, dendritas y somas (subunidades $\alpha 5$) [2-4].

e. Receptores Purinérgicos

El 5'-trifosfato de adenosina (ATP) está probablemente en cada célula viviente y representa la principal fuente de energía de fosfatos orgánicos utilizados en el

metabolismo celular [5]. Quizás por esto los organismos han desarrollado células especializadas para detectar ATP cuando es liberado extracelularmente. Las purinas actúan en una grande y diversa familia de receptores. El papel que juegan las purinas en la transmisión sináptica depende de la presencia y/o distribución de los receptores purinérgicos cerca de los sitios de liberación. Estos receptores han sido divididos dentro de dos principales familias: receptores P2, activados predominantemente por ATP y ADP (Difosfato de Adenosina); y los receptores P1, activados predominantemente por AMP (Monofosfato de Adenosina) y adenosina [6]. Todas las vesículas sinápticas contienen ATP, el cual es co-liberado con uno o más neurotransmisores clásicos. La aplicación extracelular de ATP a neuronas puede generar respuestas eléctricas.

Una nueva familia de receptores canal son los purinérgicos (P2X), activados por el ATP los cuales pueden mediar potenciales postsinápticos excitadores rápidos en varios sitios del SN, como por ejemplo el SNE. Además de activar los receptores P2X, el ATP también activa receptores metabotrópicos, los cuales están ligados a proteínas G y segundos mensajeros [6].

Todos los receptores P2X forman canales selectivamente permeables a cationes, los cuales distinguen poco entre el Na^+ y el K^+ pero muestran una permeabilidad variable para el Ca^{2+} [6, 7].

Al menos siete diferentes subunidades de receptores P2X han sido clonados, P2X₁ al P2X₇, los cuales se expresan de manera abundante en el SN y en células musculares e inmunológicas [6, 7].

f. Cotransmisión e Interacciones entre Receptores Canal

Es probable que la mayor parte de las neuronas usen más de un neurotransmisor. En apoyo a esta idea, varios neurotransmisores y neuromoduladores son encontrados dentro de la misma terminal nerviosa de neuronas centrales y periféricas, incluyendo el SNE. Por ejemplo, algunos neuropéptidos se encuentran en vesículas sinápticas de muchas terminales nerviosas donde coexisten con otros de ellos o bien con neurotransmisores clásicos tales como la noradrenalina (NA), la dopamina(DA), ACh, el glutamato, y el GABA [8]. Otro ejemplo es el ATP, el cual se comporta como neurotransmisor clásico y puede ser coliberado con la NA, ACh, y GABA [9-12]. La glicina y el GABA son también coliberados en terminales sinápticas del cordón espinal [13]. Las consecuencias de la coliberación de estos neurotransmisores pueden ser variables y la mayoría de las veces, se desconocen.

El concepto de cotransmisión ha sido revisado por Burnstock [9] y sus implicaciones en la modulación de redes neuronales han sido recientemente revisadas por Nusbaum *et al.* [14]. En los mamíferos, uno de los ejemplos de cotransmisión mejor estudiados ha sido el que ocurre en las terminales nerviosas simpáticas de algunos músculos viscerales. En estos tejidos, el ATP y la NA son liberados por las mismas terminales nerviosas y actúan sinérgicamente sobre la contracción muscular [9]. Interacciones análogas podrían esperarse cuando sustancias neuroactivas son liberadas de células no neurales. Por ejemplo, las plaquetas y las células cebadas pueden liberar ATP, serotonina (5-HT), e histamina [15, 16]. La liberación simultánea de sustancias neuroactivas puede también ocurrir durante respuestas fisiopatológicas tales como la inflamación [15, 17]. Los efectos de los transmisores que son simultáneamente liberados

suelen ser complejos. En particular, cuando sus receptores (o sus señales de transcripción) interactúan entre sí. Relevante al concepto de neurotransmisión en el SNE, se han encontrado varias observaciones interesantes sobre la interacción entre receptores purinérgicos ligados a proteínas G y otros receptores análogos [18, 19]. Aún más relevantes, son los últimos resultados sobre la interacción cruzada entre diferentes poblaciones de receptores canal, los cuales median la transmisión sináptica rápida. En particular, aquellas interacciones entre canales P2X y nACh [20, 21], entre los P2X y los $5HT_3$ [21, 22].

Hipótesis de los dos receptores compartiendo un solo canal

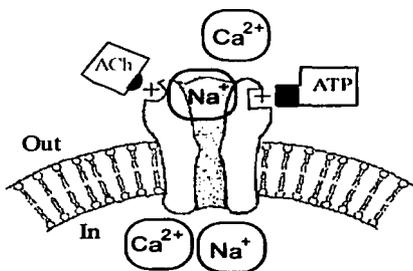


Figura 2 Representación esquemática de la hipótesis de sobreposición de canales propuesta por Nakazawa (1994).

Barajas-López *et al.* (1998), reportaron resultados similares a los encontrados por Nakazawa, en las neuronas del plexo submucoso, cuando se registró a un potencial de -60 mV. Sin embargo, a $+40$ mV las corrientes fueron aditivas. A este potencial, la amplitud de la $I_{ACh+ATP}$ no fue diferente a la $I_{esperada}$, descartando la hipótesis de Nakazawa

Nakazawa [23] sugirió que los receptores P2X y los nACh compartían el mismo canal en las neuronas simpáticas de rata (Figura 2). Esta hipótesis de sobreposición de canales fue basada sobre el hecho de que la aplicación simultánea del ATP y la ACh induce una corriente ($I_{ACh+ATP}$) menor que la suma ($I_{ACh}+I_{ATP} = I_{esperada}$) de las corrientes inducidas por la aplicación individual (I_{ACh} y I_{ATP}) de estos agonistas.

[20]. Esto último demostró que I_{ATP} y la I_{ACh} son mediadas por diferentes poblaciones de canales. De acuerdo con esta idea, los receptores P2X y nACh poseen propiedades farmacológicas y fisiológicas muy distintas. Las cuales incluyen: 1) la desaparición específica de la I_{ACh} en parches de membranas neuronales; 2) diferente sensibilidad a bloqueadores de canales, por ejemplo el hexametonio bloquea únicamente los canales nACh; 3) Diferente potencial de inversión para las corrientes inducidas por ACh y ATP, indicando una permeabilidad iónica diferente para estos canales; 4) una cinética de desensibilización diferente; y 5) una desensibilización independiente. Todas estas observaciones concuerdan con el hecho de que los canales nACh y los P2X tienen una estructura molecular muy distinta [11, 24-28], e ilustran el hecho de que los receptores P2X y nACh no comparten el mismo canal. Lo cual implica la existencia de otro mecanismo responsable de la oclusión entre la I_{ACh} y la I_{ATP} .

Nuestras observaciones también brindan información sobre el mecanismo que parece estar involucrado en esta oclusión. Así, ésta ocurre tan pronto como los canales se activan (<1 ms), parece ser mediada por la entrada de iones a través de estos canales, y no requiere de la presencia de Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , ni de la activación de proteínas G o de fosforilación proteica. Estas observaciones sugieren que esta oclusión es mediada por interacciones alostéricas directas entre los canales P2X y nACh o bien mediante interacciones alostéricas que involucran una estructura (proteína) vecina a estos canales. Ambas explicaciones asumen que los receptores canal involucrados se encuentran localizados muy cerca uno del otro dentro de la membrana neuronal. Formando quizás unidades funcionales las cuales tendrían, al menos, un canal de cada tipo. La Figura 3

muestra una representación de esta hipótesis. Experimentos más recientes han revelado también oclusión entre las corrientes inducidas por el ATP y las inducidas por 5HT [22].

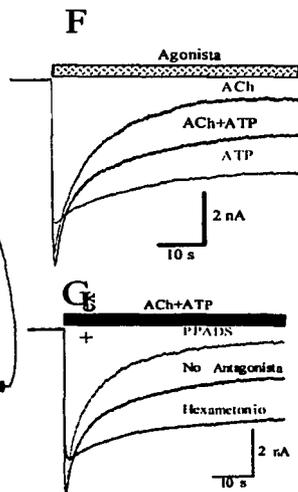
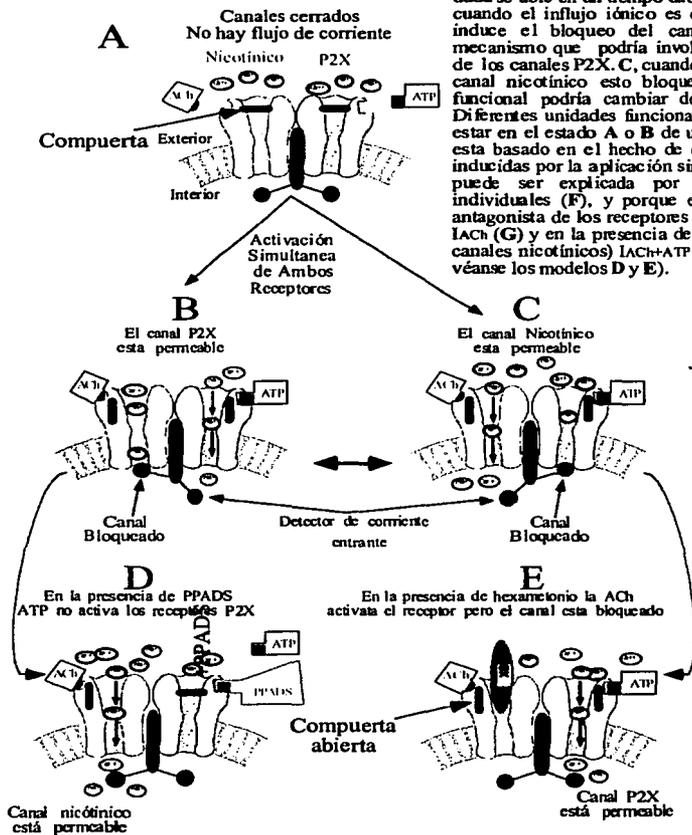
III.-JUSTIFICACION DEL TRABAJO

El presente proyecto de investigación brindará información esencial sobre las interacciones entre receptores canal P2X y GABA_A, lo cual nos ayudará a comprender los mecanismos de integración sináptica en el SNE, en particular, el sistema nervioso en general. Esta información es importante para el desarrollo de procedimientos experimentales y terapéuticos dirigidos a modificar la actividad sináptica del tracto gastrointestinal(TGI) y del SN. Lo cual es necesario para comprender el control de la motilidad, la secreción, la percepción sensorial, y la integración del señalamiento neural.

Podríamos también predecir que dichas observaciones pueden tener un impacto más amplio sobre otras áreas, por ejemplo, las alteraciones inhibitoras aquí estudiadas podrían permitir al GABA inhibir no solo la despolarización sino también el movimiento iónico inducido por la apertura de los canales activados por P2X. Es importante destacar que algunos subtipos de estos últimos canales son altamente permeables al Ca²⁺ y que este ion no solo es un importante mensajero intracelular sino que también puede inducir efectos citotóxicos en altas concentraciones. Por lo cual, una predisposición a la degeneración neuronal sería de esperarse si el mecanismo de regulación entre los canales, GABA_A y los P2X fallase. Por lo tanto, nuestros datos también servirán para proponer hipótesis nuevas sobre la degeneración neuronal que involucrarían el posible fallo de las interacciones inhibitoras entre canales GABA_A y otros canales excitadoras permeables a los iones Ca²⁺.

Modelo hipotético para explicar las interacciones inhibitorias entre los canales P2X y nicotínicos

Figura 3. Hipótesis de trabajo de las interacciones inhibitorias entre canales. A, los canales están organizados en unidades funcionales las cuales poseen al menos un receptor canal de cada tipo. Cuando los receptores son simultáneamente activados, únicamente uno de los dos canales de una subunidad dada se abre en un tiempo dado, como se muestra en B y C. B, cuando el influjo iónico es detectado en el canal P2X, este induce el bloqueo del canal nicotínico, a través de un mecanismo que podría involucrar las terminales carboxílicas de los canales P2X. C, cuando el influjo iónico se detecta en el canal nicotínico esto bloquea los canales P2X. La unidad funcional podría cambiar del estado A al B o viceversa. Diferentes unidades funcionales de una célula dada podrían estar en el estado A o B de una manera azarosa. Este modelo esta basado en el hecho de que la cinética de las corrientes inducidas por la aplicación simultánea de los dos agonistas no puede ser explicada por la cinética de las corrientes individuales (F), y porque en la presencia de PPADS (un antagonista de los receptores P2X) ICh+ATP es muy similar a ICh (G) y en la presencia de hexametonio (bloqueador de los canales nicotínicos) ICh+ATP es muy similar a IATP sola (G; véanse los modelos D y E).



IV.-HIPÓTESIS

Los receptores GABA_A al igual que los 5HT₃ y los nACh son estructuralmente similares de donde proponemos que los receptores GABA_A también interaccionan con los receptores P2X.

OBJETIVO GENERAL

Investigar si los canales GABA_A y los activados por el ATP mantienen interacciones inhibitorias cruzadas, similares a las reportadas para otros receptores canal en neuronas entéricas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar las propiedades electrofisiológicas de las corrientes de membrana inducidas por GABA y ATP, incluyendo su cinética, su dependencia del voltaje y sus bases iónicas.
2. Determinar las propiedades farmacológicas de las corrientes de membrana inducidas por GABA y ATP.
3. Investigar si los canales GABA_A y P2X se inhiben mutuamente y analizar la dependencia del voltaje de esta interacción.

V.-MATERIAL Y METODOS

a. *Material Biológico*

Se utilizaron cobayos jóvenes de 150 a 300g de peso, machos o hembras, con libre acceso a alimento y agua. Se mantuvieron a una temperatura constante de aproximadamente 23°C.

b. *Equipo*

Microscopio invertido
Amplificador Axopatch 1D
Micromanipulador
Computadora personal
Vortex-Genie
Osciloscopio
Dispositivo fast-flow
Potenciómetro
Agitador magnético
Pulidor de electrodos
Pulidor de electrodos
Mesa antivibración

Balanza digital Explorer
Balanza digital Scout
Cámara de Faraday
Baño de agua
Incubadora
Centrífuga clínica
Microscopio de disección
Refrigerador
Lámpara de luz UV
Axon Tape software

c. *Material*

Espátulas
Vidrios de reloj
Pinzas de acero inoxidable
Pisetas
Vasos de precipitados de 100mL
Contenedor de plástico de 4L
Pipetas graduadas de 10mL
Caja de Petri (3.5de diam)
Capilares de boro silicato M1B200F-6
Micropipetas Wilson

Marca

Nikon TMS
Axon Instruments
Mitutoyo
Altair 380
Fisher Scientific
Tektronix 5113
Narishige
Scientific Instrument Consort P600
Thermolyne
Narishige MF-83
Sutter Instrument Co. Mod-87
Technical manufacturing Corporation (TMC)
Ohaus
Ohaus
S/D
Precision Scientific
Nuairé
Du Pont Instruments
Bausch and Lomb
General Electric
Phillips
Axon Instruments

Marca

Fisher
Pyrex
Dumont
Nalgene
Pyrex
VWR Canlab
Pyrex
Sarstedt
World Precision Instruments Inc.
Mandel Scientific

Frascos de vidrio de 20mL
 Cubreobjetos de vidrio
 Filtros para esterilizar 0.22 micrón
 Pipetas Pasteur de cuello largo
 Equipo de disección
 Caja de cultivo de 24 pozos
 Gradilla
 Tubo de plástico estériles 15mL
 Caja Petri con silgard
 Propipeta
 Guantes de látex

d. Reactivos

Agua nanopura
 NaCl
 Glucosa
 HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-
 N'-[2-ethanesulfonic acid])
 CsCl
 CaCl₂.2H₂O
 EGTA
 GTP 5'-trifosfato de guanosina
 GABA Acido gamma amino butírico
 ATP Mg 5'-trifosfato de adenosina sal de
 magnesio
 ATP Na 5'-trifosfato de adenosina sal
 disódica
 CsOH
 NaOH
 Solución de Hanks
 Papaina
 Colagenasa
 Dispasa
 Penicilina
 Estreptomcina
 Dextrosa anhidra
 Cisteína
 Glutamina
 Medio L15
 Solución de Krebs
 Medio mínimo esencial (MEM)
 Sacarosa
 184 silicón elastómero
 Etanol 95%

S/D
 Corning Glass works
 Millex-Gp
 Kimby
 Dumont
 Sarstedt
 Nalgene
 Sarstedt
 Sarstedt
 Drummond
 Ansell

Marca

S/D
 Caledon Laboratories Ltd.
 Sigma
 Sigma
 Sigma
 BDH Inc.
 Sigma
 Sigma
 Sigma
 Sigma
 Sigma
 Sigma
 Sigma
 Sigma
 GIBCO
 Couper/Worthington
 Worthington
 Boehringer-Mannheim
 GIBCO
 GIBCO
 Fisher Scientific
 Sigma
 GIBCO
 GIBCO
 GIBCO
 GIBCO
 BDH Inc
 Dowcoming Co.
 S/D

e. Técnica de Patch-Clamp

Las técnicas de *patch-clamp* fueron diseñadas principalmente para el estudio de corrientes iónicas en pequeños parches en la membrana, en los cuales hay perfecto control del voltaje transmembranal[29]. Sin embargo, la configuración de célula completa (*whole-cell*) es usada rutinariamente en laboratorios de electrofisiología para el estudio de corrientes iónicas a través de la membrana de pequeñas células. La introducción de estas técnicas en los 70's y el subsecuente desarrollo de los amplificadores comerciales ha permitido el descubrimiento y la caracterización de numerosos canales iónicos.

Esta técnica esta basada en una simple idea. Un microelectrodo de vidrio con una pequeña apertura es usado para hacer un contacto ajustado en una pequeña área, o parche, de la membrana neuronal. Después de aplicar una pequeña cantidad de succión al microelectrodo por medio de la boca o una pequeña jeringa, rápidamente da la formación de un gigasello, dicho sello llega a ser tan fuerte que los iones pueden fluir entre el microelectrodo y la membrana. De esta manera todos los iones fluyen al interior del microelectrodo cuando un canal único se abre, es decir el interior del microelectrodo llega a ser continuo con el citoplasma de la célula, produciendo una conveniente ruta para la inyección de sustancias en el interior de la célula parchada. Los resultados de la corriente eléctrica, aunque pequeños, pueden ser medidos con un ultrasensible amplificador electrónico conectado al microelectrodo de registro. Como el método convencional de voltaje-clamp, el método de patch-clamp permite el control experimental del potencial de membrana para caracterizar la dependencia del voltaje de la corriente de membrana.

Los componentes electrónicos del área de registro de patch-clamp son: amplificador patch-clamp, osciloscopio, estimulador, computadora, filtro de señal externo y VCR recorder. El componente eléctrico más importante es el amplificador patch-clamp el cual es un convertidor de corriente a voltaje.

La corriente fluye a través del microelectrodo y cruza una resistencia de alta impedancia causando una caída de voltaje que es proporcional a la corriente medida por el microelectrodo. Un amplificador es usado para ajustar automáticamente la fuente de voltaje para mantener el potencial del microelectrodo constante en el potencial de referencia deseado.

Para registrar los rápidos cambios en el potencial de membrana durante la transmisión de los impulsos nerviosos, el microelectrodo esta conectado a un osciloscopio.

Durante la colocación del microelectrodo, la resistencia del electrodo es monitoreada continuamente por la aplicación de un pequeño pulso de voltaje hacia el microelectrodo. Al contacto con la célula, la resistencia del microelectrodo espontáneamente incrementa un 10 a 50%.

f. Cultivo Celular

Se utilizaron cobayos jóvenes, ya sean machos o hembras de 150 a 300g de peso, se dejaron sin sentido y se desangraron inmediatamente por medio de decapitación. Se extrajo un segmento del intestino delgado, yeyuno de alrededor de 5 cm de longitud, se colocó en solución de Krebs modificada y se abrió longitudinalmente. La mucosa y submucosa fueron removidas mediante disección, al igual que la capa de músculo circular

dejando la capa de tejido mientérico que es con la que se trabaja. La solución de Krebs modificada esta compuesta de (mM): 126 NaCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 5KCl, 25 NaHCO₃, 11 glucosa; la solución se gasificó con 95% de O₂ y 5% de CO₂.

g. Método de Disociación de Neuronas de Tejido Mientérico de Cobayo [30]

El tejido disecado (plexo mientérico) se transfirió a un tubo con solución de Krebs. Con anterioridad se pesaron 3.6 mg de cisteína y se disolvieron en 9 mL de solución salina balanceada de Hanks, se ajustó el pH a 7.3 con NaHCO₃ 0.15 M con indicador rojo de fenol en CMFH. Se adicionó 0.1 mL de papaína, ésta es una suspensión en látex que debe ser mezclada antes de adicionarse. Con una pipeta Pasteur se resuspendió varias veces sin agitar el tubo, ya que se pueden desnaturalizar las enzimas, en este punto la solución es turbia. Se colocó el tubo en un baño María a 37°C hasta que la solución fuera otra vez clara con lo cual se activan a las enzimas, esta solución se esterilizó mediante un filtro estéril (0.2 micrón). Se tomaron 3 mL de esta solución de papaína y se adicionaron al tejido. Enseguida se incubó el tejido en la solución de papaína por 10 minutos a 37°C. Se eliminó la solución de papaína y se lavó el tejido dos veces con 3 a 5 mL de medio L15. Esto se hace para inactivar las enzimas. Una vez transcurridos los 10 minutos se hizo la siguiente solución: en 10 mL de solución de Hanks se agregó colagenasa a una concentración de 1 mg/mL y dispasa 4 mg/mL. La solución se esterilizó por medio de un filtro. Se tomaron 3 mL de esta solución y se incubó el tejido anterior a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, se trituró el tejido en la solución de enzimas 30 veces cada 10 minutos, durante dos ciclos solamente, con una pipeta Pasteur de cuello largo esto debe hacerse suavemente sin formar burbujas ya

que se pueden lisan las células. La pipeta Pasteur que se utiliza para la trituración deberá tener la punta redondeada mediante exposición al fuego. Después de dos ciclos de trituración el tejido debe estar dispersado.

Se adicionaron 5 a 7 mL de medio L15. Se centrifugó en una centrifuga clínica a 600 rpm durante 5 minutos. Se removió el sobrenadante y se descartó. Suavemente se resuspendió el botón de células formado en 5 mL de medio L15 y se centrifugó otra vez, nuevamente descartar el sobrenadante. Se resuspendió el botón en 12 mL de medio de cultivo para lograr la densidad deseada.

Los cubreobjetos de vidrio se colocaron uno en cada pozo de la caja de cultivo y se esterilizaron mediante exposición a luz Ultravioleta por 20 a 30 minutos. Posteriormente se cubrieron con una capa de colágena de cola de rata y se sometieron nuevamente a radiación durante 20 minutos (no más ya que se desnaturaliza la colágena). Este paso se realiza 1 o 2 horas antes para que la colágena seque perfectamente y permita la adecuada adherencia de las células.

Finalmente, se colocan las células en la caja de cultivo preparada con anterioridad, aproximadamente 1.5 mL de la suspensión en cada pozo de la caja. El medio de alimentación contiene por cada 100 mL: MEM (medio mínimo esencial); 2.5 mL de suero de cobayo, 1000 U/mL de penicilina y estreptomycin, 1 mL de glutamina 200 μ M, 1 mL de solución de dextrosa al 20% (w/v), 10 μ M de ARA (antimitótico), 10 μ M de uridina. Por último el cultivo se mantuvo en incubación a 37°C, 95% de CO₂ y 5% de O₂.

h. Microelectros de registro

Los microelectrodos se fabricaron utilizando capilares de borosilicato y el estirador de pipetas Sutter Instrument Co. (Mod-87). Posteriormente, las pipetas fueron pulidas utilizando el microscopio/pulidor Narishige (MF-83) hasta que el diámetro externo de la punta de la pipeta fue de 1.5 a 2 μm .

i. Registros de las Corrientes

Las corrientes de célula completa (*whole-cell*) fueron registradas utilizando cultivos primarios de neuronas del plexo mientérico. Los registros fueron realizados entre 2 y 48 horas después del inicio de los cultivos. La corriente de membrana fue registrada usando un amplificador 1D Axopatch. La corriente *whole-cell* fue grabada con ayuda de una computadora personal utilizando el software AxoTape (Axon Instruments).

La cámara de registro fue perfundida continuamente con la solución externa (SE#1) a una velocidad de flujo de aproximadamente 2 mL/min.

La aplicación de las sustancias experimentales se hizo mediante un dispositivo formado por ocho tubos muy delgados constituyendo una barrera (Figura 4). Primero se colocó el tubo que contiene sólo la solución externa (control) frente a la neurona cuyas corrientes de membrana están siendo registradas. Este tubo control se mantiene abierto todo el tiempo. Con el tubo control frente a la neurona se abre el tubo que contiene la sustancia experimental (p. ej. GABA) y después de unos segundos se mueve el sistema de multitubos, con la ayuda de un manipulador Narishigue, de tal forma que el tubo deseado queda frente a la neurona. Para lavar la sustancia experimental, se regresa el tubo control frente a la neurona, después de lo cual se cerró el tubo con la sustancia

experimental. Enseguida, se procedió a la aplicación del segundo agonista (ATP) de la forma anteriormente explicada. Cinco minutos después de la aplicación del segundo agonista se procedió a la aplicación simultánea de ambas sustancias (GABA+ATP) durante periodos de 3-30 s. Cinco minutos después de la aplicación de ambos agonistas se midieron de nuevo las corrientes inducidas por la aplicación individual de GABA y ATP. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (~23°C).

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente por la prueba de "t de Student" no correlacionada de dos colas.

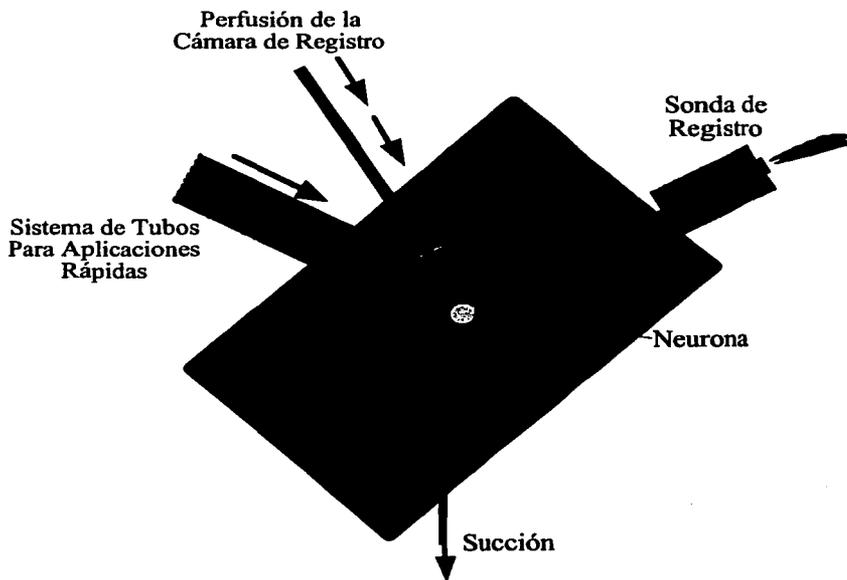


Figura 4. Representación esquemática de cámara de registro y del sistema de tubos para aplicaciones rápidas de las soluciones experimentales.

VI.-RESULTADOS

a. *Propiedades generales de las corrientes de membrana inducidas por GABA y ATP.*

Las corrientes de membrana activadas por GABA (I_{GABA}) y ATP (I_{ATP}) en neuronas entéricas han sido previamente caracterizadas [30-34]. Estas corrientes difieren en varias propiedades básicas. Por ejemplo, la primera es mediada por receptores canal permeables a Cl^- ($GABA_A$) mientras la segunda es mediada por canales permeables a cationes (P2X). Las relaciones corriente/voltaje muestran una fuerte rectificación interna para los receptores canal P2X y una rectificación externa para los $GABA_A$.

A menos que se especifique otra solución, los siguientes experimentos se realizaron utilizando la solución interna SI#3 (dentro de la célula) y la solución externa SE#1 (véase Cuadro 1) y a un potencial de membrana de -60 mV. En tales condiciones experimentales ambas corrientes, I_{GABA} y I_{ATP} , fueron negativas (Figura 5).

CUADRO 1. COMPONENTES DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS

Solución	Componentes(mM)							
SI#1	Gluconato de Cs(130)		NaCl(10)	EGTA(10)	HEPES(5)	MgATP(4.5)	GTP(0.1)	
SI#2	Gluconato de Cs(65)		NaCl(10)	EGTA(10)	HEPES(5)	MgATP(4.5)	GTP(0.1)	Sacarosa (140)
SI#3	CsCl(140)		NaCl(10)	EGTA(10)	HEPES(5)	MgATP(4.5)	GTP(0.1)	
SE#1	CsCl(3)	CaCl ₂ (2)	NaCl(160)	-----	HEPES(4.8)	-----	-----	-----

Aproximadamente el 69% (n=67) y el 88% (n=85) de un total de 97 neuronas registradas, respondieron a la aplicación de GABA o de ATP, respectivamente. Las curvas de concentración respuesta fueron obtenidas para estos transmisores en neuronas mientéricas y analizadas como se reportó previamente [30, 34]. Los valores de las concentraciones medias (CE_{50}) para GABA y el ATP fueron 83 y 55 μ M (Figura 6 y 7), respectivamente. En catorce células analizadas, las corrientes inducidas por

concentraciones máximas de GABA(300 μ M) y ATP (1 mM) tuvieron una amplitud promedio 1080 ± 224 , y -1684 ± 173 pA, respectivamente. El rango de amplitudes fue bastante variable desde unos cuantos pA hasta aproximadamente 6 nA.

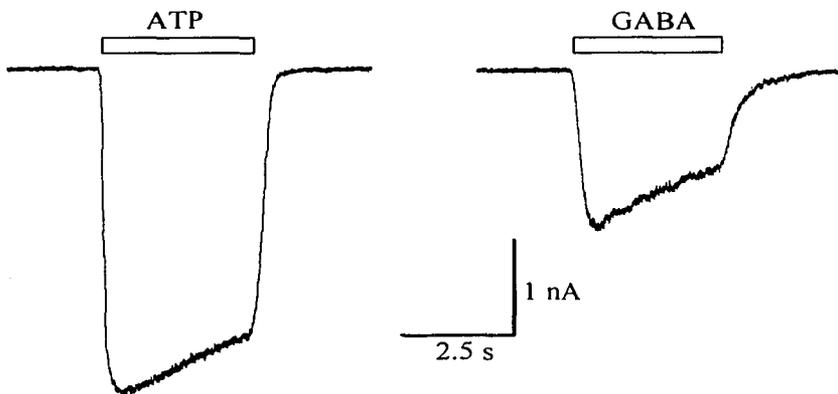


Figura 5. Las corrientes inducidas por la aplicación del ATP (1 mM) o del GABA (300 μ M), tienen una cinética diferente. La diferencia más grande se observa durante el regreso de la corriente a su valor control, después de suspender la aplicación del agonista. Nótese que la corriente inducida por GABA regresa de una manera más lenta que la inducida por el ATP. La aplicación del agonista, es indicada por las barras, que presenta la corriente inducida por GABA (IGABA) es más lenta que la que presenta la corriente inducida por ATP (IATP). Los registros provienen de la misma célula mientésica y fueron realizados a -60 mV.

El pico de la corriente fue alcanzado más rápidamente por la I_{ATP} que por la I_{GABA} , lo cual sucedió dentro del primer segundo y dentro de los primeros 2 segundos, respectivamente, después de agregar los agonistas. Después de alcanzar un valor máximo, las dos corrientes disminuyeron, a pesar de la presencia continua de los agonistas, revelando una desensibilización de los dos receptores. Al retirar el agonista, las corrientes regresaron a su nivel inicial dentro de los primeros 2 s para ATP y dentro de los 5 segundos para el GABA.

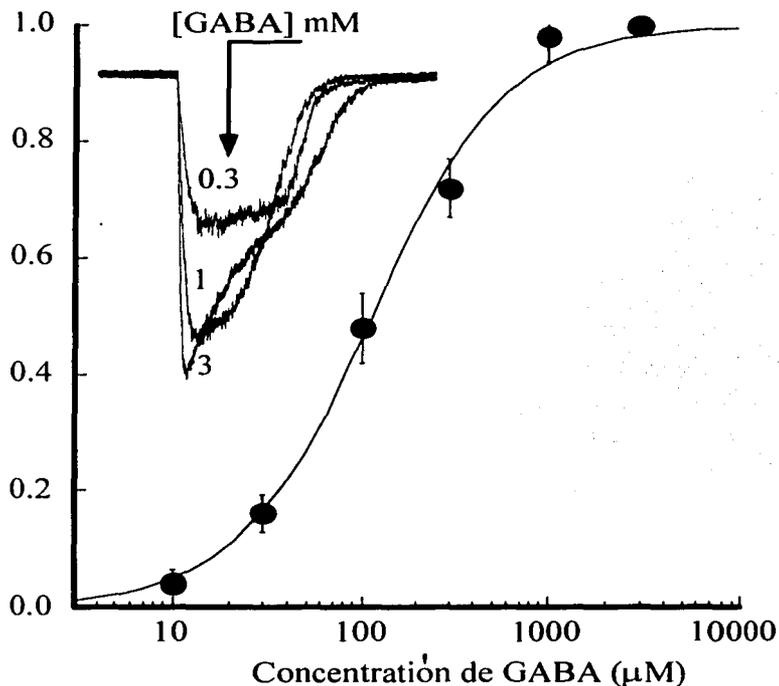


Figura 6. La corriente de membrana inducida por el GABA en neuronas masticas es dependiente de la concentración. Los círculos representan el promedio de la amplitud relativa de las corrientes inducidas con diferentes concentraciones del GABA. Las líneas asociadas a los círculos representan el error estándar de la media. Los registros provienen de 5 a 7 células masticas y fueron realizados a -60 mV. Un ejemplo de esto son los registros mostrados.

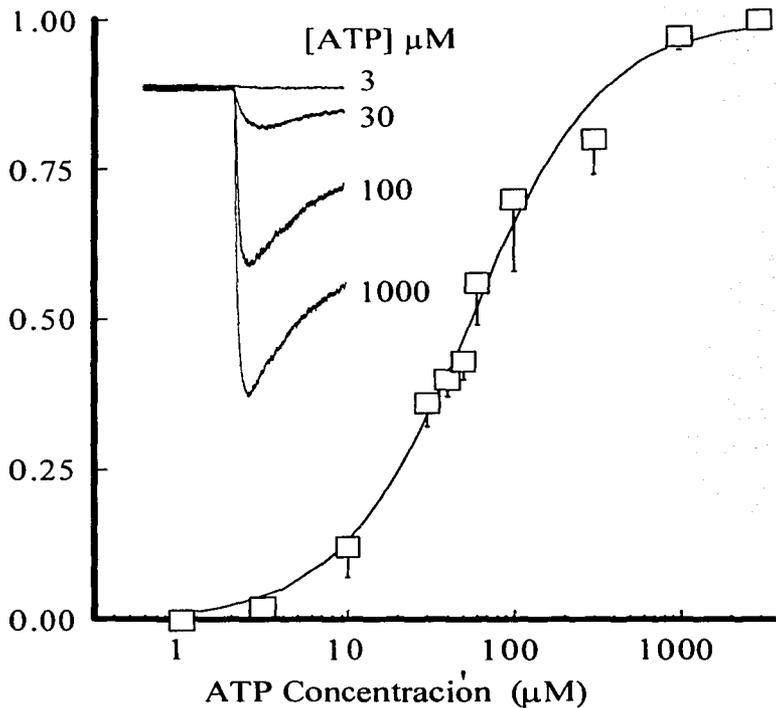


Figura 7. La corriente de membrana inducida por el ATP en neuronas mientéricas es dependiente de la concentración. Los círculos representan el promedio de la amplitud relativa de las corriente inducidas con diferentes concentraciones del ATP. Las líneas asociadas a los círculos representan el error estándar de la media. Los registros provienen de 4 a 9 célula mientéricas y fueron realizados a -60 mV. Un ejemplo de esto son los registros mostrados.

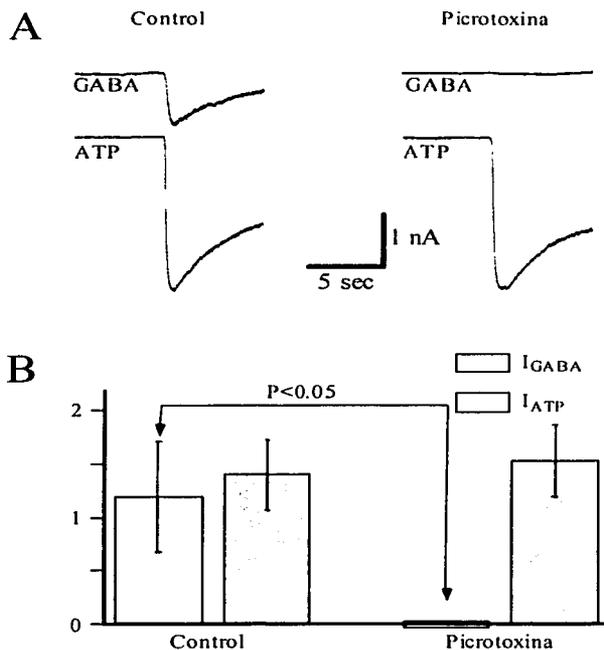


Figura 8. Como se esperaba, la picrotoxina, un bloqueador específico de los receptores GABA_A, inhibe las corrientes inducidas por GABA (0.3 mM) y no la corriente inducida por ATP (1 mM). (A) Un ejemplo de corrientes registradas antes y en la presencia de picrotoxina (1 mM) en la misma neurona mientérica. (B) muestra los promedios y el error estándar de experimentos similares (n=4). Estos experimentos fueron realizados a -60 mV. de membrana de -60.

Las corrientes entrantes inducidas por GABA o ATP (1 mM) fueron específicas y significativamente inhibidas por picrotoxina ($CE_{50}=1$ mM, Figura 8) y PPADS (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfónico acid) (30 μ M, Figura 9), respectivamente. La amplitud promedio de la I_{ATP} antes de la aplicación de PPADS fue -1849 ± 352 mientras que después fue -62 ± 34 pA (n=3).

En los experimentos descritos se demostró que la I_{GABA} y la I_{ATP} son mediadas por la activación de receptores farmacológicamente distintos en las neuronas mientéricas, los GABA_A y los P2X. A continuación se analizó la hipótesis de que estos canales interaccionan entre sí.

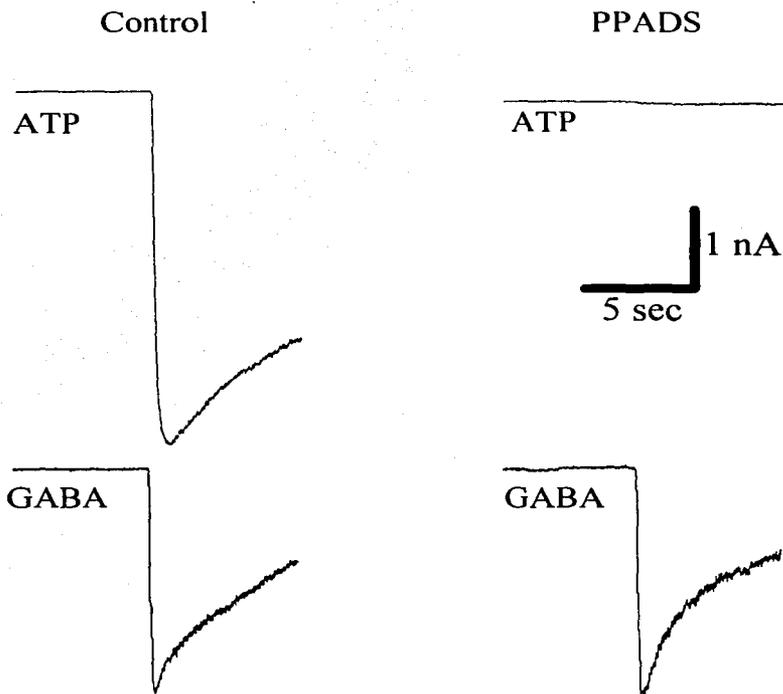


Figura 9. Como se esperaría, el PPADS, un bloqueador específico de los receptores P2X, inhibe las corrientes inducidas por ATP (1 mM) y no la corriente inducida por GABA (300 μ M). Se muestran registros típicos de corrientes registradas antes y en la presencia de PPADS (30 μ M) en la misma neurona mientérica a un potencial de membrana de -60 .

b. Las corrientes de membrana inducidas por GABA y por ATP son oclusivas.

Si I_{ATP} y I_{GABA} son mediadas por poblaciones de canales totalmente independientes entonces, las corrientes inducidas por una concentración máxima de al menos uno de

estos transmisores (cuando la ocupación de estos es cercana al 100%) debería de ser aditiva. Por lo cual, medimos los picos de las corrientes de membrana inducida por la aplicación de 300 μ M GABA y de ATP (1 mM). La concentración de GABA fue seleccionada porque fue la máxima a la cual las corrientes fueron casi siempre reproducibles dentro de un periodo de aplicación de 5 min. Concentraciones mayores requerirían periodos más prolongados entre aplicaciones para mantener la reproducibilidad de estas corrientes. La amplitud de las corrientes inducidas por la aplicación de ambos antagonistas ($I_{GABA+ATP}$) también fue medida en las mismas neuronas mientéricas. Se encontró que la suma de las corrientes individuales ($I_{ATP}+I_{GABA}=I_{esperada}$) fue significativamente más grande que la $I_{GABA+ATP}$, lo cual reveló una oclusión entre la I_{GABA} y la I_{ATP} (Figura 10; n=11). Dicha oclusión parece ocurrir tan pronto como las corrientes son activadas (Figura 11).

c. Efecto del cambio de la dirección de corriente sobre la oclusión entre los canales $GABA_A$ y los P2X.

En los siguientes experimentos se utilizó una solución intracelular baja en Cl^- (solución SI#1, véase el cuadro 1). Además, las corrientes de membrana fueron registradas a -10 mV, voltaje al cual I_{GABA} es saliente y I_{ATP} es entrante (Figura 11A). La Figura 11 B muestra los resultados promedio de tales experimentos, donde se encontró que la corriente inducida por ambos agonistas no es significativamente diferente que la $I_{esperada}$. En otras palabras, la interacción entre canales $GABA_A$ y P2X fue prevenida cuando se invierten las corrientes de Cl^- .

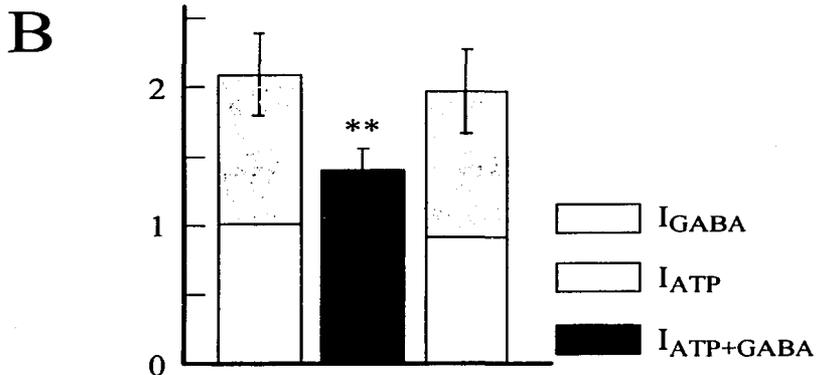
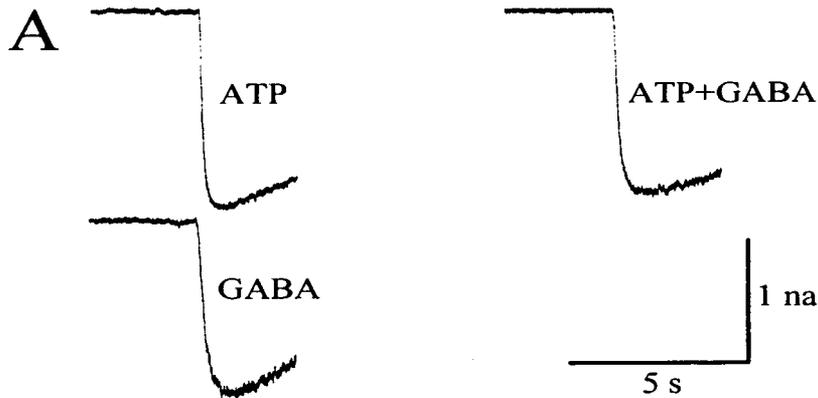


Figura 10. Las corrientes inducidas por el GABA y el ATP en neuronas mientéricas no son aditivas, revelando una oclusión funcional entre estas corrientes. (A) Registros de una neurona de un experimento típico. **(B)** Los valores promedio de 11 experimentos son mostrados. Las corrientes fueron inducidas por la aplicación de GABA (300 μ M), ATP (1 mM) y por la aplicación simultánea de ambos agonistas ($I_{GABA+ATP}$). La I_{GABA} y la I_{ATP} fueron registradas 5 minutos antes y 5 minutos después de $I_{GABA+ATP}$. **, $P < 0.01$.

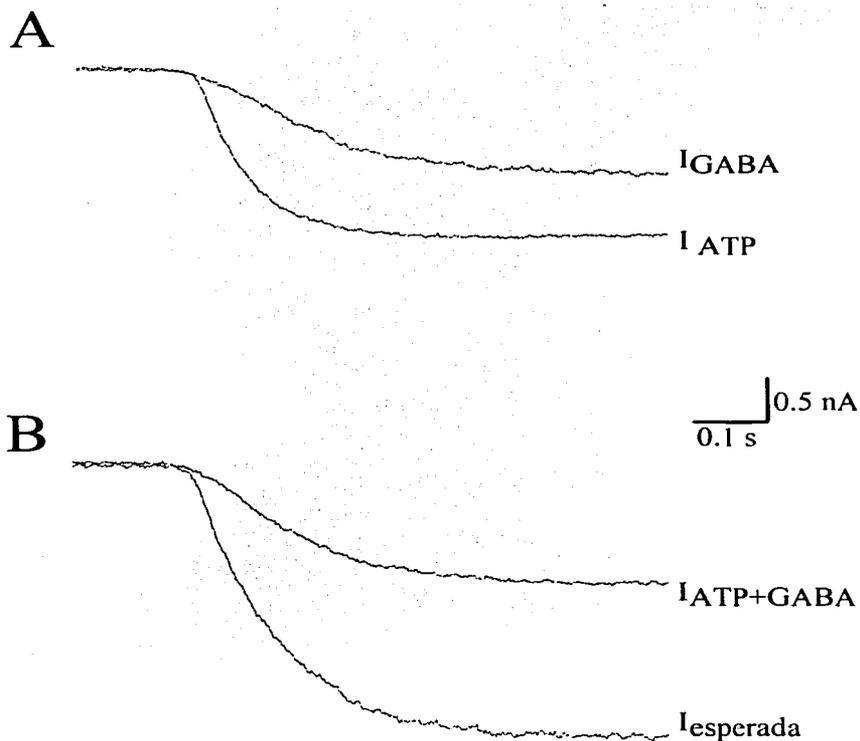


Figura 11. Velocidades de activación de las diferentes corrientes registradas en la misma neurona mientérica. (A) La velocidad de activación de la corriente activada por el ATP (I_{ATP}) es más rápida que la activada por el GABA (I_{GABA}). **(B)** La velocidad de activación de la corriente activada por el ambos agonistas ($I_{ATP+GABA}$) es más lenta que la corriente esperada ($I_{GABA+IATP}=I_{esperada}$). Esto último muestra que la oclusión entre los canales GABAA y P2X se inicia tan pronto como éstos se activan. Estas corrientes fueron registradas a un potencial de membrana de -60mV .

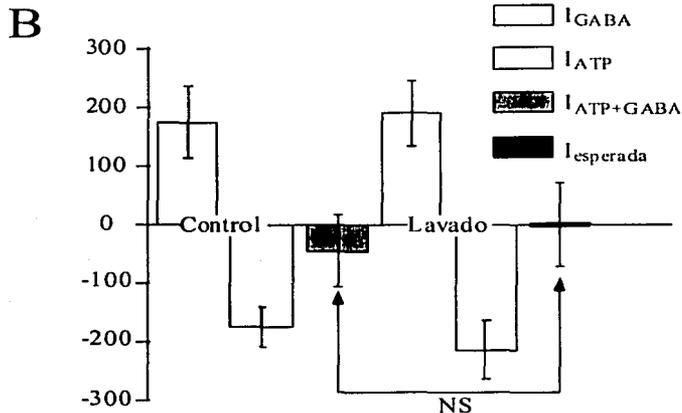
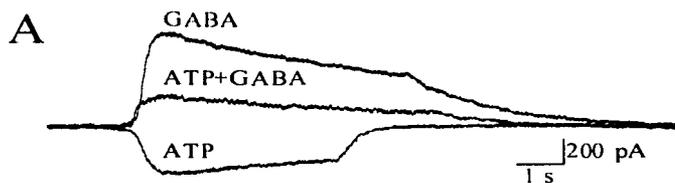


Figura 12. Las corrientes inducidas por ATP (I_{ATP}) y GABA (I_{GABA}) fueron aditivas cuando dichas corrientes son en dirección contraria. (A) Registros de las corrientes I_{ATP} , I_{GABA} y $I_{ATP+GABA}$ en una misma neurona mientérica. Estos fueron tomados a -10 mV y en presencia de una baja concentración de Cl^- dentro de la célula (se usó la solución SI#1, ver Cuadro 1) por lo cual, I_{ATP} y I_{GABA} tienen una dirección opuesta. **(B)** Promedios y errores estándar de 6 experimentos como los mostrados en A. Las corrientes individuales fueron restadas al menos cinco minutos antes (control) y 5 minutos después (lavado) de la aplicación simultánea de ambos agonistas. La corriente inducida por la aplicación simultánea de ambos agonistas ($I_{GABA+ATP}$) no es diferente que la suma de las corrientes individuales ($I_{esperada}$).

También se efectuaron experimentos a -60 mV y con una concentración alta de Cl^- dentro de la célula (solución SI#3, Cuadro 1), en presencia de un bloqueador de los canales GABA_A (picrotoxina) y se investigaron los efectos del GABA sobre la I_{ATP} en presencia de este bloqueador. La Figura 13 muestra como en presencia de picrotoxina, el GABA no tiene ningún efecto sobre la I_{ATP} . Demostrando que se requiere de que exista salida de Cl^- para afectar los canales P2X.

En experimentos subsecuentes, se analizó si el GABA o el ATP modificaban la corriente inducida por el otro agonista. Para ello se efectuaron experimentos al potencial de inversión de ambos agonistas y los resultados de estos son mostrados en la Figura 13. Dichos experimentos utilizando la solución SI#2 (Cuadro 1). El ATP no modificó la I_{GABA} cuando los experimentos se realizaron al potencial de inversión para la I_{ATP} (15 ± 2.4 mV). Resultados similares se obtuvieron con el GABA. Es decir, el GABA no modificó la I_{ATP} cuando los experimentos se efectuaron al potencial de inversión de la I_{GABA} (-8.8 ± 2.4).

En Presencia de Picrotoxina

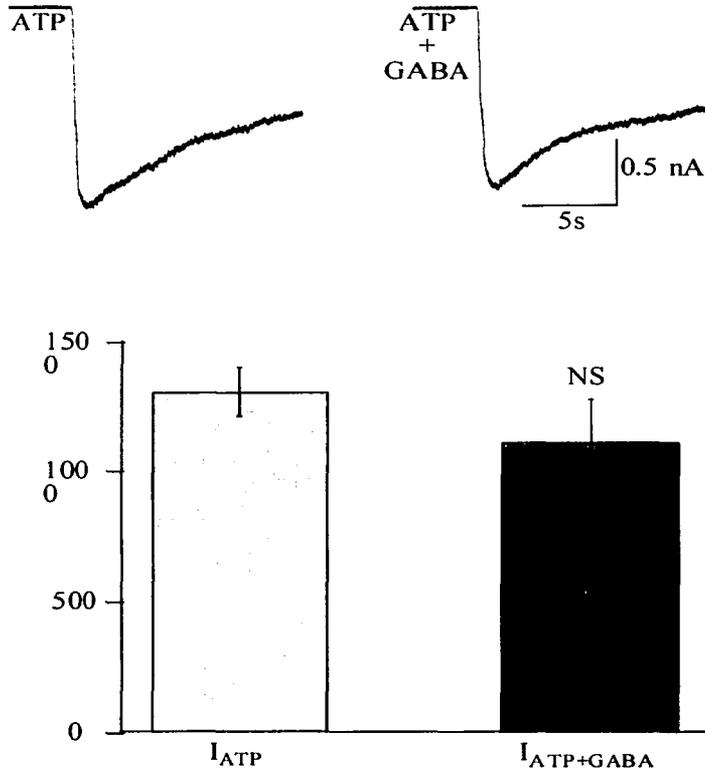


Figura 13. GABA no tiene ningún efecto sobre los canales P2X cuando los GABA_A son bloqueados con picrotoxina (1 mM). (A) Registros de la corriente inducida por ATP (I_{ATP}) antes y en presencia de GABA (5 min después). **(B)** Promedios y errores estándar de 4 experimentos similares donde se muestra que la I_{ATP} es igual antes y después de agregar GABA. Estos experimentos fueron realizados en presencia continua de picrotoxina y a un potencial de membrana de -60 mV).

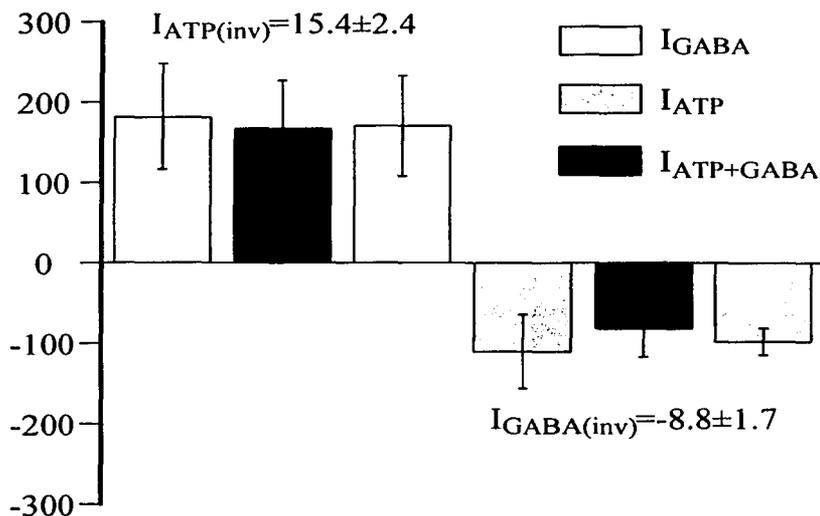


Figura 14. GABA y ATP no tienen ningún efecto sobre los canales P2X y GABAA, al potencial de inversión de I_{GABA} y I_{ATP} , respectivamente. Promedios de estas corrientes y de la corriente inducida por la aplicación de ambos agonistas ($I_{ATP+GABA}$) son mostrados. Así como los errores estándar del promedio. Las corrientes inducidas por GABA son positivas y las corrientes inducidas por ATP son negativas debido a que se estos experimentos se realizaron en la presencia de una concentración moderada de Cl^- y al potencial de inversión de I_{GABA} y I_{ATP} como se indica.

VII.-DISCUSIÓN

Los resultados presentados muestran que en las neuronas mientéricas del intestino del cobayo, la activación de receptores $GABA_A$ y P2X, con GABA y ATP, respectivamente, abren dos diferentes poblaciones de canales. La activación de estos canales es sin embargo, no independiente y las corrientes transmitidas a través de ellos son mutuamente oclusivas cuando los canales son activados de manera simultánea. Esto implica que hay interacciones inhibitorias entre estas dos poblaciones de canales. Tales interacciones ocurren tan pronto como se presenta la activación de estos receptores canal sugiriendo que son independientes de la activación de proteína G, segundos mensajeros, o de fosforilación proteica. Lo cual implicaría que la oclusión de entre estas corrientes podría ser mediadas por la interacción directa entre los canales $GABA_A$ y P2X.

Las corrientes inducidas por GABA ($300\mu M$) o ATP ($1mM$) eran específicamente bloqueados por picrotoxina y PPADS, respectivamente, aunque a la alta concentración del agonista usado aquí se pueden activar específicamente receptores farmacológicamente distintos en neuronas mientéricas. El hecho de que las amplitudes de esas dos corrientes sean independientes una de otra en las neuronas registradas implica que esos receptores canal pueden ser expresados separadamente en esas neuronas.

Las corrientes entrantes llevadas a través de los receptores $GABA_A$ y P2X son activadas específicamente por el GABA y el ATP. En apoyo a esta conclusión, esta el hecho de que la picrotoxina y el PPADS inhiben específicamente estas corrientes. Además, la dependencia del voltaje de la I_{GABA} fue modificada por cambios en la concentración de Cl^- mientras que la dependencia del voltaje de la I_{ATP} fue modificada

por cambios en la concentración de cationes [30]. Estas son propiedades clásicas de estos receptores [4].

Las corrientes mediadas por los canales GABA_A y P2X del plexo mientérico son oclusivas, esto es son aditivas, como sería de esperarse si fueran canales totalmente independientes. Esto implicaría que estos canales parecen mantener una inhibición cruzada análoga a la descrita entre los canales P2X y los nACh y a la mantenida entre los canales P2X [20, 33] y los receptores 5HT₃ [22].

Una interacción inhibitoria similar entre receptores nicotínicos y P2X en neuronas simpáticas de rata, fue reportado por Nakazawa [23] quien explica esas observaciones proponiendo una hipótesis de sobreposición o traslape de canales (Figura 1). De acuerdo a esta hipótesis, una subpoblación de receptores nACh forman parte de los mismos canales con receptores P2X. Esta hipótesis, sin embargo, fue descartada previamente ya que la interacción de dichos canales es dependiente del voltaje y no se observa a potencial de membrana de +40 mV. En este potencial las corrientes inducidas por la aplicación simultánea de ATP + ACh es similar a la suma de las corrientes inducidas por aplicaciones individuales de ATP o ACh. Por lo tanto, I_{ATP} e I_{ACh} son mediadas por diferentes poblaciones de canales, de otro modo ellas no podrían sumarse a ningún potencial. En el presente trabajo se encontró también que la interacción de los canales GABA_A y los P2X es dependiente del voltaje. De hecho las corrientes a través de éstos, se sumaron a -20 mV. Lo cual es un fuerte argumento a favor de que estos canales son distintos y concuerda muy bien con el hecho de que los canales GABA_A y P2X tienen estructuras diferentes [4, 24, 35].

Varias observaciones descartan que la oclusión entre estos dos receptores canal es debida a una interacción no específica entre las moléculas del ATP y el GABA. Primero en células en las que la I_{GABA} fue previamente bloqueada con picrotoxina, $I_{GABA+ATP}$ tenía exactamente la misma amplitud y cinética como la corriente inducida por ATP solo. Segundo, la interacción entre los dos canales es voltaje dependiente (ver párrafo anterior). Tercero, los efectos inhibidores del GABA sobre la I_{ATP} fueron prevenidos al registrar estas últimas en el potencial de inversión de la I_{GABA} . Cuarto, los efectos inhibidores del ATP sobre la I_{GABA} fueron prevenidos al registrar estas últimas en el potencial de inversión de la I_{ATP} .

También, es probable que esta interacción inhibidora no solo requiera activación de receptores, pero de hecho los canales requieren ser abiertos, desde picrotoxina, una sustancia que se es un bloqueador de canales $GABA_A$, no antagonista competitivo de estos receptores [4], evita los efectos de GABA sobre la I_{ATP} . De acuerdo con esta interpretación está el hecho de que la inhibición del flujo a través de los canales $GABA_A$ o de los canales P2X también previene los efectos inhibidores sobre los canales opuestos (ver los dos últimos resultados mencionados en el párrafo anterior).

La corta latencia para esa corriente de oclusión sugiere que no son requeridos segundos mensajeros para esas interacciones inhibidoras. De acuerdo con tal interpretación, en un estudio previo se encontró, que la inhibición de proteínas G (con N-ethylmaleimide), o su modificación funcional (reemplazando GTP con GTP- γ -S en la solución de la pipeta), y la inhibición de proteínas de fosforilación (con staurosporina, K252 o genisteína) no modifica la oclusión observada entre la I_{ACh} y la I_{ATP} [20] y entre la I_{ATP} y la I_{SHIT} [22].

VIII.-CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que hay una muy rápida interacción inhibitoria entre los canales GABA_A y P2X, la cual ocurre solamente para corrientes entrantes. Estas interacciones ocurren tan pronto como ocurre la activación de estos receptores canal, apoyando la hipótesis que los canales GABA_A y P2X están localizados muy cerca uno del otro en la membrana neuronal, quizás formando unidades funcionales constituidas por al menos un canal de cada tipo. Esta hipótesis es una extensión del bien conocido fenómeno que los receptores canal, como otras proteínas, no difunden libremente en la membrana sino que éstos están claramente localizados bajo la terminal presináptica apropiada. Varias proteínas han sido propuestas para ser involucradas en el agrupamiento de los canales iónicos en sitios específicos de la membrana, por ejemplo 43/rapsina, se cree es la responsable del agrupamiento de los canales nicotínicos [36]. El hecho de que tales interacciones inhibitorias parecen ocurrir solamente cuando los canales, GABA_A o P2X, permeables sugiere la existencia de un mecanismo sensorial específico para movimientos iónicos. Por lo tanto, nosotros proponemos un modelo en el cual la detección del flujo iónico en un canal (p.ej. en el P2X) podría inducir cambios alostéricos en los canales vecinos (GABA_A) los cuales lo bloquearían. De tal forma que los dos canales de la unidad funcional particular nunca podrían estar abiertos al mismo tiempo. El efecto inhibitorio en el segundo canal podría desaparecer una vez que el flujo iónico a través del primer canal ha sido detenido.

Un significado funcional de esta interacción inhibitoria podría ser el ahorro energético celular limitando el movimiento iónico. Sin embargo, otra posibilidad es que

estas interacciones son uno más de la compleja red de mecanismos de regulación sináptica que existen en el sistema nervioso.

Una importancia clínica podría sospecharse, si se considera que las alteraciones inhibitoras aquí estudiadas permitirían al GABA inhibir no solo la despolarización sino también el movimiento iónico inducido por la apertura de los canales activados por P2X. A este respecto, es importante destacar que algunos subtipos de estos últimos canales son altamente permeables al Ca^{2+} y que este ion no solo es un importante mensajero intracelular sino que también puede inducir efectos citotóxicos en altas concentraciones [4, 37]. Por lo cual, una predisposición a la degeneración neuronal sería de esperarse si el mecanismo de regulación entre los canales GABA_A y los P2X fallase. Así pues, nuestros datos apoyan la hipótesis según la cual el posible fallo de las interacciones inhibitoras entre canales GABA_A y los P2X podrían incrementar las probabilidades de degeneración neuronal.

IX-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kandel, E.R., J.H. Schwartz, and T.M. Jessell, *Principles of neural sciences*. 4th ed. 2000, New York, NY: McGraw-Hill.
2. Hammond, C., *Cellular and molecular neurobiology*. 1 ed. 1996, Paris France: Academic Press. 453.
3. Zimmermann, H., *Synaptic Transmission. Cellular and Molecular Basis*. 1993, Frankfurt am Main Germany: Gulde Druck GmbH.
4. Conley, E.C., *The Ion Channel, Extracellular Ligand-Gated Channels*. FactsBook Series. Vol. I. 1996, New York, NY: Academic Press.
5. Barajas-López, C. and J.D. Huizinga, *New transmitters and new targets in the autonomic nervous system. [Review] [94 refs]*. *Current Opinion in Neurobiology*, 1993. **3**: p. 1020-1027.
6. Khakh, B.S., et al., *International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits*. *Pharmacological Reviews*, 2001. **53**(1): p. 107-18.
7. Dunn, P.M., Y. Zhong, and G. Burnstock, *P2X receptors in peripheral neurons*. *Progress in Neurobiology*, 2001. **65**(2): p. 107-34.
8. Deutch, A.Y., and Roth R.H., *Neurotransmitters*. *Fundamental neuroscience*, ed. F.B.A. Bloom F.E., Landis S.C. Roberts J.L., Squire L.R., and Zigmond M.J. 1999, San Diego, CA: Academic Press. 193-234.
9. Burnstock, G., *Co-transmission*. *Arch. Int.Pharmacodyn. Ther.*, 1990. **304**: p. 7-33.
10. von Kugelgen, I., *Co-release of noradrenaline and ATP from cultured sympathetic neurons*. *Neuroscience*, 1994. **61**(2): p. 199-202.
11. North, R.A. and E.A. Barnard, *Nucleotide receptors*. *Current Opinion in Neurobiology*, 1997. **7**(3): p. 346-57.
12. Jo, Y.H. and R. Schlichter, *Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. [see comments]*. *Nature Neuroscience*, 1999. **2**(3): p. 241-5.
13. Jonas, P., *Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. [see comments.]*. *Science*, 1998. **281**(5375): p. 419-24.
14. Nusbaum, M.P., *The roles of co-transmission in neural network modulation*. *Trends in Neurosciences*, 2001. **24**(3): p. 146-54.
15. Arvier, P.T., et al., *Modification by capsaicin and compound 48/80 of dye leakage induced by irritants in the rat Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses*. *British Journal of Pharmacology*, 1996. **16**: p. 1197-1207.
16. Fraser, R.A. and J.G. Simpson, *Role of mast cells in experimental tumour angiogenesis*. *Ciba Foundation Symposium*, 1983. **100**: p. 120-131.
17. Collins, S.M., et al., *Effect of inflammation of enteric nerves. Cytokine-induced changes in neurotransmitter content and release. [Review]*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1992. **664**: p. 415-424.
18. Barajas-López, C., *Interactions between inhibitory and excitatory modulatory signals in single submucosal neurons*. *American Journal of Physiology*, 1994. **267**: p. C1359-C1365.

19. Palmer, J.M., J.D. Wood, and D.H. Zafirov, *Transduction of aminergic and peptidergic signals in enteric neurones of the guinea-pig*. Journal of Physiology - London, 1987. **387**: p. 371-383.
20. Barajas-López, C., R. Espinosa-Luna, and Y. Zhu, *Functional interactions between nicotinic and P2X channels in short-term cultures of guinea-pig submucosal neurons [see comments]*. Journal of Physiology - London, 1998. **513**: p. 671-683.
21. Boue-Grabot, E., et al., *Physical interaction and cross-talk between two classes of neurotransmitter-gated channels*. Neuron, 2002. **To be re-submitted (Appendix 2e)**.
22. Barajas-López, C., L.M. Montano, and R. Espinosa-Luna, *Inhibitory interactions between 5HT and P2X channels in submucosal neurons*. American Journal of Physiology, 2002. **In press**.
23. Nakazawa, K., *ATP-activated current and its interaction with acetylcholine-activated current in rat sympathetic neurons*. Journal of Neuroscience, 1994. **14**: p. 740-750.
24. Brake, A.J., M.J. Wagenbach, and D. Julius, *New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor*. Nature (Lond.), 1994. **371**: p. 519-523.
25. Le, K.T., K. Babinski, and P. Seguela, *Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor*. Journal of Neuroscience, 1998. **18**(18): p. 7152-9.
26. Lindstrom, J., *Neuronal nicotinic acetylcholine receptors. [Review] [270 refs]*. Ion.Channels., 1996. **4**: p. 377-450.
27. Lindstrom, J., et al., *Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. [Review] [65 refs]*. Progress in Brain Research, 1996. **109**: p. 125-137.
28. Soto, F., et al., *P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**: p. 3684-3688.
29. Hamill, O.P., et al., *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflügers Archives-European Journal of Physiology, 1981. **391**: p. 85-100.
30. Barajas-López, C., et al., *P2x-purinoceptors of myenteric neurones from the guinea-pig ileum and their unusual pharmacological properties*. British Journal of Pharmacology, 1996. **119**: p. 1541-1548.
31. Barajas-López, C., R. Espinosa-Luna, and V. Gerzanich, *ATP closes a potassium and opens a cationic conductance through different receptors in neurons of guinea pig submucosal plexus*. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics, 1994. **268**: p. 1397-1402.
32. Poulter, M.O., *GABA(A) receptor subunit messenger RNA expression in the enteric nervous system of the rat: implications for functional diversity of enteric GABA(A) receptors*. Neuroscience, 1999. **93**(3): p. 1159-65.
33. Zhou, X. and J.J. Galligan, *Non-additive interaction between nicotinic cholinergic and P2X purine receptors in guinea-pig enteric neurons in culture [see comments]*. Journal of Physiology - London, 1998. **513**: p. 685-697.

34. Bertrand, P.P. and J.J. Galligan, *Alfaxalone, pentobarbital and diazepam potentiate gamma-aminobutyric acid-induced depolarizations in single myenteric neurons of guinea pig intestine*. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 1992. **262**(2): p. 677-82.
35. Surprenant, A., G. Buell, and R.A. North, *P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels*. *Trends in Neurosciences*, 1995. **18**(5): p. 224-9.
36. Sheng, M. and E. Kim, *Ion channel associated proteins*. [Review] [63 refs]. *Current Opinion in Neurobiology*, 1996. **6**: p. 602-608.
37. Rudolphi, K.A., et al., *Adenosine and brain ischemia*. [Review] [179 refs]. *Cerebrovascular & Brain Metabolism Reviews*, 1992. **4**: p. 346-369.