

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

MECANISMOS INTRACELULARES DEL ANTIDEPRESIVO
TRICICLICO IMPRAMINA EN LA INHIBICION DE LA
CORRIENTE M EN NEURONAS SIMPATICAS DE RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

PSIC. JANIA LIDICE CUELLAR QUINTERO

Facultad de Medicina



DIRECTOR DE TESIS:
DR. DAVID E. GARCIA DIAZ

MEXICO, D. F.

2005

0349498



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jania Lidice Cuellar Quintana

FECHA: 19/ Octubre / 2005

FIRMA: Jania Lidice

El trabajo presentado se realizó en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección del Dr. David E. García, y gracias al apoyo económico otorgado por el CONACyT y por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	VIII
AGRADECIMIENTOS.....	IX
1. ABREVIATURAS.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES.....	5
3.1. Descubrimiento de la corriente M.....	5
3.2. Electrofisiología de la corriente M: características cinéticas.....	5
3.3. Fisiología de la corriente M.....	8
3.3.1. Contribución de la corriente M al potencial de membrana en reposo.....	8
3.3.2. Contribución de la corriente M a los potenciales sinápticos.....	10
3.3.3. Contribución de la corriente M a la excitabilidad.....	12
3.4. Farmacología del canal M.....	14
3.4.1. Bloqueadores de la corriente M.....	14
3.4.2. Activadores de la corriente M.....	16
3.5. Biología molecular del canal M (KCNQ2/KCNQ3).....	17
3.6. Regulación de la corriente M mediada por receptores acoplados a proteínas G.....	19
3.6.1. Vía principal de señalización que inhibe a la corriente M: surgimiento de la hipótesis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato como segundo mensajero.....	21
3.6.2. Biosíntesis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.....	27
3.7. Regulación de la corriente M por calcio.....	28
3.8. Otras vías de regulación de la corriente M.....	32
3.9. Acciones clásicas de los antidepresivos tricíclicos.....	34
4.0. Acciones de los antidepresivos tricíclicos sobre los canales iónicos.....	35
4.1. Los antidepresivos tricíclicos y sistemas de señalización intracelular.....	37

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	39
5. HIPÓTESIS.....	41
6. OBJETIVOS.....	42
6.1. Objetivo General.....	42
6.2. Objetivos Específicos.....	42
7. METODOS.....	43
7.1. Cultivo de las neuronas del ganglio simpático cervical superior.....	43
7.2. Preparación de cultivos primarios de las neuronas del ganglio simpático cervical superior.....	43
7.3. Registro electrofisiológico de la corriente M.....	46
7.3.1. Aislamiento de la corriente de K^+ tipo M.....	46
7.3.1.1. Decaimiento espontáneo de la corriente M.....	47
7.4. Reactivos.....	49
8. RESULTADOS.....	50
8.1. Caracterización de la corriente M en cultivos primarios de las neuronas del ganglio simpático cervical superior de rata.....	50
8.2. La imipramina inhibe la corriente M en forma reversible y dependiente de la concentración.....	54
8.3. La inhibición de la corriente M es insensible al voltaje.....	56
8.4. La imipramina aplicada en la pipeta de registro reduce la corriente M.....	58
8.5. La inhibición de la corriente M por imipramina aumenta a un pH 8.....	60
8.6. La imipramina inhibe la corriente M sin la activación de la proteína G.....	62
8.7. La imipramina requiere de la activación de la fosfolipasa C para inhibir la corriente M.....	65
8.8. La aplicación intracelular de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato previene la inhibición de la corriente M por imipramina.....	70

9. DISCUSIÓN.....	75
9.1. La imipramina inhibe al canal M sin cambios en la sensibilidad al voltaje	75
9.2. La imipramina neutra es la forma activa que inhibe la corriente M.....	76
9.3. La imipramina atraviesa la membrana para activar a la fosfolipasa C e inhibir a la corriente M.....	77
9.4. La hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato es la base del efecto de la imipramina sobre la corriente M.....	80
9.5. La imipramina y su interacción con la fosfolipasa C.....	81
9.6. Implicaciones clínicas.....	82
10. CONCLUSIONES.....	84
11. PERSPECTIVAS.....	85
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
13. ANEXOS: TRABAJOS PUBLICADOS.....	101
Quintero JL, Arenas MI, Garcia DE. The antidepressant imipramine inhibits M current by activating a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-dependent pathway in rat sympathetic neurones. <i>Br J Pharmacol</i>, 145:837-843; 2005.....	101
Cuellar-Quintero JL, Garcia DE, Cruzblanca H. The antidepressant imipramine inhibits the M-type K⁺ current in rat sympathetic neurons. <i>Neuroreport</i> 12:2195-2198, 2001.....	109

INDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS Y TABLAS

Esquema 1	Registro de corrientes registradas en una neurona simpática de rana toro.....	6
Esquema 2	La corriente M y la corriente h participan en el establecimiento del potencial de reposo de neuronas del ganglio simpático cervical superior.....	10
Esquema 3	Efectos predichos de la activación de la corriente M durante despolarizaciones “sinápticas” breves a un potencial de -53 mV.....	11
Esquema 4	Efecto de la muscarina en la excitabilidad neuronal.....	12
Esquema 5	Efecto de la muscarina (mus) y de la d-tubocurarina (dTc) en fijación de corriente y en la frecuencia de disparos de las neuronas del ganglio simpático cervical superior de rata.....	14
Esquema 6	Vía de regulación en la que interviene un segundo mensajero difusible.....	16
Esquema 7	Ilustración del experimento de Soejima y Noma (1984).....	26
Esquema 8	Biosíntesis de los fosfoinosítidos.....	28
Esquema 9	Representación esquemática de las vías de señalización que regulan a la corriente M.....	33
Esquema 10	Estructura química de la imipramina.....	35
Esquema 11	Posibles formas de interacción entre la IMI y la PLC.....	82
Fig. 1	Inhibición típica de la corriente M por oxotremorina-M.....	52
Fig. 2	Caracterización farmacológica de la corriente M.....	53
Fig. 3	Efecto de la imipramina sobre la corriente M.....	55
Fig. 4	Curva de conductancia-voltaje de la corriente M.....	57
Fig. 5	Efecto de la aplicación de la imipramina en la pipeta de registro sobre la corriente M.....	59
Fig. 6	Efecto del pH en la inhibición de la corriente M por imipramina.....	61
Fig. 7	Efecto de la imipramina sobre la corriente M en presencia del bloqueador de proteínas G, GDPβS.....	64
Fig. 8	Efecto de la bradicinina y la imipramina sobre la corriente M en presencia del inhibidor de la fosfolipasa C, U73122.....	66

Fig. 9 Efecto de la imipramina sobre la corriente M en presencia del quelante de Ca^{2+} BAPTA.....	68
Fig. 10 Efecto de la Oxotremorina-M y la imipramina sobre la corriente M en presencia del inhibidor de fosfolipasa C, U73122.....	69
Fig. 11 Recuperación de la corriente M de la inhibición por Oxotremorina-M e imipramina en presencia de Wortmanina.....	71
Fig. 12 Recuperación de la corriente M de la inhibición por IMI en presencia de wortmanina en células independientes.....	72
Fig. 13 Efecto de la imipramina sobre la corriente M bajo la aplicación intracelular de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.....	73
Tabla 1 Parámetros derivados del ajuste de una función de Boltzmann.....	57

RESUMEN

Tras años de investigación, la hipótesis para la regulación del canal de potasio tipo M propone que la reducción en la concentración del lípido membranal fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato es la señal que inhibe a la corriente M. Esta corriente controla la excitabilidad neuronal al activarse a valores cercanos al umbral del potencial de acción. Se sabe que los antidepresivos tricíclicos como la imipramina aumentan la disponibilidad de los neurotransmisores bloqueando su recaptura en las terminales aminérgicas. Sin embargo, poco se sabe acerca de sus acciones intracelulares en la regulación de los canales iónicos. El propósito de esta tesis fue estudiar si la imipramina afecta la cascada de señalización intracelular que regula a la corriente M en neuronas simpáticas de rata, mediante la técnica de fijación de voltaje en configuración célula completa. La diálisis de las células con el bloqueador de las proteínas G, GDPβS, no interrumpió la inhibición de la corriente M. La incubación de las células con el inhibidor de la fosfolipasa C, U73122, previno la inhibición de la corriente M. Cuando se dializaron las células con un quelante de calcio intracelular, no se interrumpió la inhibición de la corriente. Así mismo, la incubación de las células con el inhibidor genérico de cinasas, wortmanina, previno la recuperación de la corriente M de su inhibición por imipramina. La aplicación intracelular de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato disminuyó la inhibición de la corriente M. Estos resultados sugieren que la recuperación de la corriente M requiere de la resíntesis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, y que la imipramina inhibe esta corriente activando la vía dependiente de fosfolipasa C que como consecuencia reduce la concentración de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. David E. García Díaz por aceptarme en su grupo de trabajo y confiarme su proyecto de investigación.

A los miembros de mi comité tutorial por su apoyo y aportaciones para la realización de este trabajo.

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Dr. Stefan Mihailescu

A los miembros de la comisión revisora por sus valiosos comentarios y sugerencias.

Dr. Dieter Mascher Gramlich

Dr. David E. García Díaz

Dr. José Jesús García Colunga

Dr. Gabriel Roldán Roldán

Dra. María Elvira Galarraga Palacio

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Dr. Stefan Mihailescu

Al Dr. José María Farias Sánchez por su apoyo en la elaboración de la tesis.

1. ABREVIATURAS

ACh. Acetilcolina

AKAP. Proteína de anclaje de la proteína cinasa A

ATC. Antidepresivo tricíclico

BC. Bradicinina

B₂R. Receptor de bradicinina B₂

[Ca²⁺]_i. Concentración de calcio intracelular

CaM. Calmodulina

DAG. 1,2-diacilglicerol

EPSP. Potencial postsináptico excitatorio

G_{αq/11}. Subunidad α de la familia de las proteínas G_q y G₁₁

IC₅₀. Concentración inhibitoria media

I_M. Corriente M

IMI. Imipramina

IMIn. Imipramina en su forma neutra

IP₃. 1,4,5-trifosfato de inositol

LHRH. Hormona luteneizante liberadora de hormona

Oxo-M. Oxotremorina-M

Proteínas G. Proteínas reguladoras de GTP

PIP₂. Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PKC. Proteína cinasa C

PLC. Fosfolipasa C

PTX. Toxina pertusis

SCGs. Neuronas del Ganglio Simpático Cervical Superior

SNC. Sistema nervioso central

TEA. Cloruro de Tetraetilamonio

TTX. Tetrodotoxina

M₁AChR. Receptor muscarínico M₁

2. INTRODUCCIÓN

La transmisión de las señales neuronales depende de cambios rápidos en la diferencia del potencial eléctrico a través de la membrana celular. Estos cambios están mediados por un tipo de proteínas transmembranales, los canales iónicos, que permiten el flujo rápido de iones a través de la membrana celular. Los canales iónicos se consideran elementos fundamentales de la excitabilidad celular. La diversidad de los canales iónicos en el sistema nervioso favorece la transmisión de señales específicas. Los canales difieren unos de otros de acuerdo con su permeabilidad selectiva a los iones. A los canales que forman poros de alta selectividad para el paso específico de los iones de K^+ a través de la membrana se les llama canales de K^+ . Estos tienen un potencial de equilibrio cercano al potencial de membrana en reposo, por lo que su apertura tiende a mantener el potencial de membrana a valores negativos, oponiéndose a la despolarización, lo cual disminuye la excitabilidad neuronal.

Los canales de K^+ son los que tienen la mayor diversidad en la familia de los canales iónicos. Actualmente se han identificado más de 100 subunidades distintas de canales de K^+ , cada una con diversas propiedades. Esta variedad se refleja en la diversidad de funciones celulares de dichos canales, las cuales incluyen entre muchas otras; la modulación de la transmisión sináptica al participar en el establecimiento del potencial de membrana en el botón sináptico, el control de la apertura de los canales de calcio y la liberación de los neurotransmisores. La regulación de estos canales, por lo tanto, incide en todos los procesos que dependen de la excitabilidad neuronal tales como la codificación de los trenes de potenciales de acción y el establecimiento de la actividad rítmica neuronal (Hille, 2001).

Los canales de K^+ se regulan principalmente por diversos neurotransmisores: directamente a través de receptores ionotópicos -en cuyo caso el receptor y el canal forman parte de una misma macromolécula-, o indirectamente a través de receptores metabotrópicos, los cuales se acoplan a los canales a través de segundos mensajeros.

De manera particular, destacan los sistemas de señalización que involucran receptores acoplados a proteínas G (Hille, 1994; Ikeda & Dunlap, 1999). En el mecanismo conocido como “delimitado a la membrana”, las proteínas G actúan directamente sobre el canal, activándolo o inhibiéndolo, sin necesidad de activar ningún mensajero intracelular (Hille, 1994). En este mecanismo, que se lleva a cabo en menos de 1 s, es el dímero $\beta\gamma$ el que regula el canal, más que la subunidad α de la proteína G (Herlitze *et al.*, 1996; Ikeda, 1996; Mirshahi *et al.*, 2003). La vía que involucra a un segundo mensajero es de 10 a 100 veces más lenta que la vía delimitada a la membrana, y activa a la proteína $G_{q/11}$ y a la fosfolipasa C (PLC), que como consecuencia de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) resulta en la formación de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) y 1,2-diacilglicerol (DAG). Los neurotransmisores y fármacos que activan o inhiben los canales de K^+ neuronales tienen, por lo tanto, efectos profundos tanto en el sistema nervioso central como en el periférico.

En la década de 1950 se desarrollaron algunos fármacos como los antidepresivos tricíclicos (imipramina, nortriptilina, desipramina entre otros) para el tratamiento de la depresión. Su efecto terapéutico por lo general se relaciona con el bloqueo de la recaptura de neurotransmisores aminérgicos (norepinefrina, dopamina y serotonina). Sin embargo, se ha reportado que estos fármacos además de interactuar con otras proteínas como receptores (Cusack *et al.*, 1984; Golds *et al.*, 1980; López-Valdés HE y García-Colunga, 2001) e

inhibidores de transportadores biogénicos de amina (Owens *et al.*, 1997), inhiben canales iónicos como los de K^+ (Delpon *et al.*, 1992; Wooltorton y Mathie, 1993, 1995; Kuo, 1998).

De manera interesante, se sabe que la corriente de K^+ neuronal, denominada corriente M (I_M), relevante por su papel en la regulación de la excitabilidad neuronal se regula por agonistas (oxotremorina-M, angiotensina II, bradicinina entre otras) que activan la cascada de señalización intracelular que involucra un segundo mensajero (Cruzblanca *et al.*, 1998; Suh y Hille, 2002; Shapiro *et al.* 1994). Dado que los antidepresivos tricíclicos (ATC) también son capaces de activar substratos intracelulares (Joshi *et al.*, 1999, Shimizu *et al.*, 1993; Fukuda *et al.*, 1994; Cadiou y Molle, 2003), en el presente trabajo de tesis se estudió la posibilidad de que la I_M fuera otro de los blancos de acción de la imipramina (IMI).

3. ANTECEDENTES

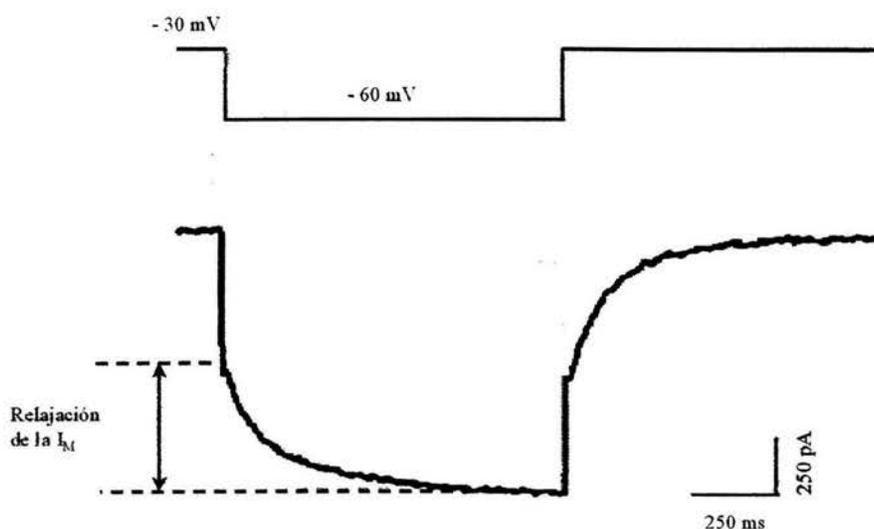
3.1. DESCUBRIMIENTO DE LA CORRIENTE M

La corriente M (I_M) se describió por primera vez por Brown y Adams (1980) en las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior (SCGs) de la rana toro, cuando estos investigadores intentaban explicar el aumento en la resistencia de membrana y los disparos repetitivos producidos por la muscarina. Describieron una corriente de K^+ pequeña (menos de 1 nA), sensible al voltaje, que desaparece en presencia de la muscarina. Su conclusión fue que la acetilcolina (ACh), al liberarse en el espacio sináptico, produce un efecto dual en las SCGs: una despolarización rápida debida a la activación de receptores ionotrópicos (nicotínicos), seguida de una despolarización lenta debida a la activación de receptores de ACh acoplados a proteínas G (muscarínicos), que inhiben corrientes sensibles al voltaje que normalmente se encuentran activas. A la corriente sensible a muscarina se le llamó I_M . Desde entonces, la I_M se ha descrito en diversos tipos neuronales tanto en el sistema nervioso central (Brown y Adams, 1980; Constanti y Brown, 1981) como en el periférico (Brown, 1988; Constanti y Sim, 1987; Storm 1989; Womble y Moisés, 1992).

3.2. ELECTROFISIOLOGÍA DE LA CORRIENTE M: CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS

El protocolo experimental clásico que se usa (Adams *et al.*, 1982a) para estudiar a la I_M en los registros de la corriente que fluye a través de una población de canales M (corriente macroscópica), consiste en la aplicación de un potencial de mantenimiento a -30 mV, seguido de un pulso hiperpolarizante a -60 mV durante 0.5 a 1 s.

A -30 mV la I_M está activada, y su amplitud va decreciendo en forma dependiente del voltaje y del tiempo durante el pulso hiperpolarizante (-60 mV), produciendo una caída en el trazo de la corriente que se ajusta a una exponencial conocida como relajación entrante (desactivación o corriente de cola). Se le llama entrante porque la corriente saliente va disminuyendo conforme se acerca al potencial de inversión para el K^+ . Al repolarizar a la célula la I_M se vuelve a desarrollar para producir una relajación saliente. Se le llama saliente porque la corriente se aleja del potencial de equilibrio para el K^+ (ver esquema 1).



Esquema 1 Registro de corrientes registradas en una neurona simpática de rana toro. El trazo superior muestra el protocolo de voltaje que se utilizó para registrar a la I_M . El trazo inferior muestra la desactivación de la I_M precedida del escalón instantáneo de corriente (modificada de Adams *et al.*, 1982a).

Durante el pulso hiperpolarizante pueden observarse claramente dos componentes: primero hay un escalón instantáneo de corriente que fluye a través de los canales de fuga y de aquellos canales M que se abrieron durante el potencial de mantenimiento pero que no tuvieron el tiempo suficiente para cerrarse durante el pulso rápido de voltaje (≤ 2 ms); posteriormente se observa una relajación entrante la cual se refleja en la disminución de la corriente saliente que fluye a través de los canales M. Esto se debe a que el canal M se va cerrando lentamente en

respuesta al pulso hiperpolarizante. Cuando se repolariza la célula a -30 mV también se observa la corriente instantánea seguida de la relajación saliente. Sin embargo, el escalón de corriente instantánea es significativamente más pequeño al que se observa al inicio del pulso hiperpolarizante. En este caso la corriente únicamente fluye a través de los canales de fuga y no a través de los canales M, puesto que estos últimos se encuentran cerrados. La relajación ascendente lenta refleja la reapertura de los canales M a -30 mV.

A partir del análisis de estas relajaciones Adams *et al.* (1982a) dedujeron la cinética de la I_M , es decir, el curso temporal con el que se desarrolla la corriente cuando el potencial de la membrana se encuentra en estado estacionario o cuando hay variaciones en el mismo. Describieron su cinética a través de un modelo bifásico abierto-cerrado en el que la transición entre ambos estados depende del movimiento de una partícula cargada única en el canal M hipotético. Experimentalmente determinaron los parámetros para este modelo midiendo la fracción de la I_M que fluye en el estado estable en cada voltaje, y la constante de tiempo (τ) de apertura y cierre de los canales M en cada voltaje. Entre los -70 mV y los -20 mV, la curva de activación para la conductancia del canal M (G_M) sigue la siguiente expresión $G_M = G_M [1 + \exp((V_{1/2} - V)/A)]^{-1}$, en donde G_M es la conductancia máxima, V es el potencial de membrana, $V_{1/2}$ es el potencial en el cual la mitad de los canales M se encuentran abiertos, y A es el factor pendiente kT/ze . Encontraron que la mitad de los canales M (potencial medio de activación) se encuentran abiertos a -35 mV, casi todos se encuentran cerrados por debajo de los -60 mV, y que los canales se abren y se cierran lentamente ($\tau \sim 100$ ms) en la región de voltaje que va desde el potencial de reposo hasta el umbral del potencial de acción.

En las SCGs de rata, el potencial medio de activación de la I_M ($V_{1/2} = -45$ mV) (Constanti y Brown, 1981) está hiperpolarizado con respecto al del rectificador tardío ($V_{1/2} = -6$ mV) (Belluzi *et al.*, 1985b) y al de la corriente de K^+ transitoria tipo A (I_A) ($V_{1/2} = -30$ mV) (Belluzi *et al.*, 1985a). Tanto la activación, como la desactivación de la corriente muestran un curso temporal lento ($\tau = 150-200$ ms). Este valor es 10 veces más lento que la constante de tiempo de desactivación del rectificador tardío o de la corriente de K^+ activada por Ca^{2+} (Adams *et al.*, 1982a,c; Brown *et al.*, 1983).

3.3. FISIOLÓGÍA DE LA CORRIENTE M

La I_M es una corriente de K^+ que está presente en diversos tipos neuronales tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. En cada una de estas células es dominante porque controla la excitabilidad al ser la única corriente activada a potenciales subumbrales que no se inactiva. Por lo tanto, y como se verá a continuación, la regulación de la I_M tiene efectos dramáticos sobre la excitabilidad neuronal al controlar el potencial de membrana, la frecuencia de disparos y la liberación de neurotransmisores.

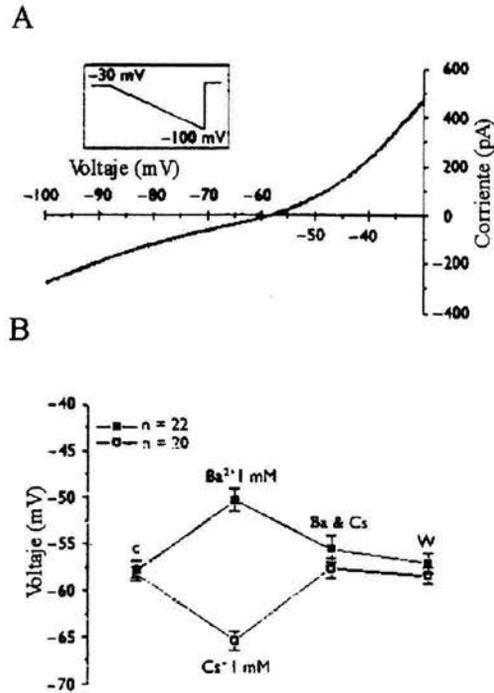
3.3.1. Contribución de la corriente M al potencial de membrana en reposo

La I_M limita los cambios en el potencial de membrana, particularmente en la dirección de la despolarización. La I_M se encuentra parcialmente activa al potencial de membrana en reposo de ~ 50 mV de las SCGs de rata. A este voltaje la mayor parte de la conductancia en reposo proviene de la I_M . Debido a que a este potencial de membrana no todos los canales M se encuentran activos, una despolarización de la célula activará más canales M. Adams *et al.*

(1982b), en experimentos de fijación de corriente de neuronas simpáticas de rana, observaron con la aplicación de un corriente despolarizante subumbral la célula se despolariza con un curso temporal exponencial. A medida que la célula se despolariza, la I_M se activa con un curso temporal de ~ 100 ms. La activación de la I_M tiende a llevar a la célula de regreso al potencial de equilibrio del K^+ . Cuando el pulso despolarizante alcanza el potencial de acción, el efecto de la I_M es similar. Inicialmente, la despolarización produce un potencial de acción (en ocasiones más de uno) pero posteriormente la activación lenta, sensible al voltaje, de la I_M tiende a hiperpolarizar a la célula y la lleva por debajo del umbral. De esta forma, la I_M actúa para inhibir el disparo repetitivo.

Las SCGs se caracterizan por tener un potencial de membrana en reposo más positivo al potencial de equilibrio del K^+ . En concordancia con los valores de potencial de membrana en reposo descritos en neuronas de hipocampo (Halliwell y Adams, 1982; Brown y Selyanko, 1985), los datos reportados indican que, en las SCGs (Jones *et al.*, 1995; Lamas, 1998; Lamas *et al.*, 2002), el potencial de reposo se estabiliza entre -50 mV y -65 mV por la activación de dos corrientes dependientes del voltaje: la I_M activada por despolarización y la corriente h (I_h) activada por hiperpolarización.

La contribución de la I_M y la I_h se puede entender tomando en cuenta que un porcentaje menor de estos canales se encuentran activos al potencial de membrana en reposo. La I_h es una corriente entrante (con una tendencia a despolarizar la célula), cuyo rango de activación es de -40 mV a -100 mV, con un voltaje de activación media a -63 mV. Esta corriente se opone a la influencia hiperpolarizante de la I_M . La I_M es un corriente que no se inactiva, y que se mantiene activa en los valores cercanos al umbral de disparo del potencial de acción (ver esquema. 2).



Esquema 2 La corriente M y la corriente h participan en el establecimiento del potencial de reposo de las SCGs. (A) Curvas corriente-voltaje obtenidas utilizando una rampa de -30 a -100 mV (5-10 mV/s). La corriente saliente se debe a la desactivación de la I_M y la entrante a la activación de la I_h . (B) Promedio de los registros del potencial de membrana en condiciones control (c, potencial de reposo), después de la despolarización producida por la aplicación de Ba^{2+} (cuadros rellenos), después de la hiperpolarización producida por la aplicación de Cs^+ (cuadros vacíos), después de la co-aplicación de ambas sustancias y después del lavado (w). El Ba^{2+} y el Cs^+ se utilizaron para bloquear a la I_M y a la I_h respectivamente (modificada de Lamas *et al.*, 1998).

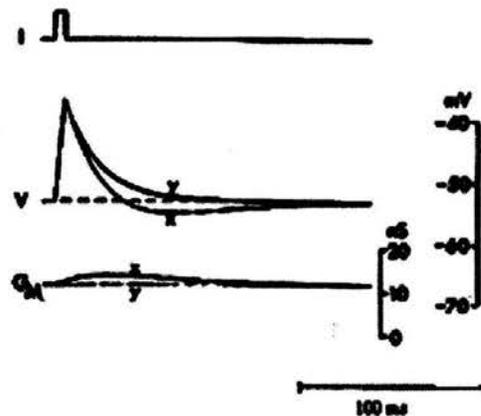
Cuando las células se despolarizan los canales M se abren y tienden a hiperpolarizar la membrana. Por lo tanto, el potencial de reposo de las SCGs se mantiene en los valores en donde las curvas de activación de la I_M e I_h se sobreponen. Es por ello, que las células quedan “fijadas” de manera bastante precisa a un potencial de reposo alrededor de -60 mV.

3.3.2. Contribución de la corriente M a los potenciales sinápticos

La I_M también se regula a nivel sináptico. En las SCGs de la rata (Brown *et al.*, 1995) y de la rana (Adams y Brown, 1982), así como en las neuronas de hipocampo (Charpak y Gahwiler, 1991), el cierre de los canales M es la base del potencial excitatorio postsináptico (EPSP) lento.

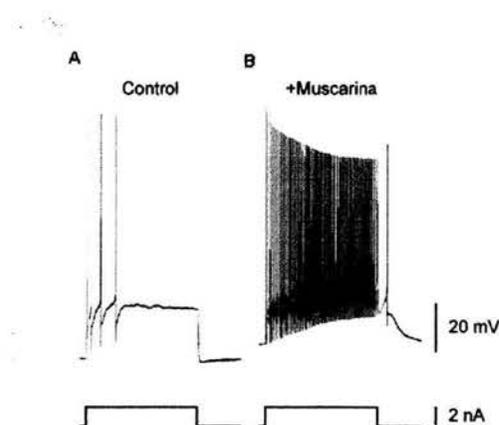
Schulman y Weight (1976) observaron, en las SCGs de rana, un aumento en la amplitud del EPSP y una facilitación sináptica durante el EPSP lento cuando inhibieron a la I_M . Concluyeron que esta facilitación era resultado de variaciones de la I_M (Schulman y Weight, 1976).

Del mismo modo, Tosaka *et al.* (1983) observaron cambios en el potencial sináptico en ausencia y en presencia del inhibidor de la I_M , muscarina. La activación de la I_M aceleró el decaimiento del potencial sináptico y produjo una marcada hiperpolarización (ver esquema 3).



Esquema 3 Efectos predichos de la activación de la corriente M durante despolarizaciones sinápticas breves a un potencial de -53 mV. Simulación de una corriente sináptica como respuesta a una inyección de corriente de +1.5 nA de 5 ms (trazo superior) y la trayectoria consecuente de voltaje calculada asumiendo que la conductancia M se mantiene constante (y) a 11.5 nS. La activación de la conductancia M sensible al voltaje reduce la amplitud del EPSP lento (modificada de Brown, 1988).

La modulación de estas corrientes por neurotransmisores también contribuye a la regulación fina del potencial de membrana en reposo. La estimulación de receptores muscarínicos en las SCGs cambia dramáticamente la excitabilidad de la membrana. En presencia de muscarina una neurona, puede pasar de un estado silente a uno excitado en el que la neurona dispara trenes de potenciales de acción (ver esquema 4).



Esquema 4. Efecto de la muscarina en la excitabilidad neuronal. Registro intracelular obtenido con el método de fijación de corriente. (A) Respuesta de una neurona ante un pulso de corriente despoliarizante de -60 mV a -30 mV. (B) Efecto de la muscarina (12.5 μ M) en la excitabilidad de la membrana (modificada de Alaburda *et al.*, 2002).

Este efecto se debe a la inhibición de la I_M (Brown y Adams, 1980). La I_M se activa lentamente cuando la neurona se despolariza hacia el umbral de disparo del potencial de acción, repolarizando la membrana hacia el valor de reposo y reduciendo la excitabilidad (Adams *et al.*, 1982a).

3.3.3. Contribución de la corriente M a la excitabilidad

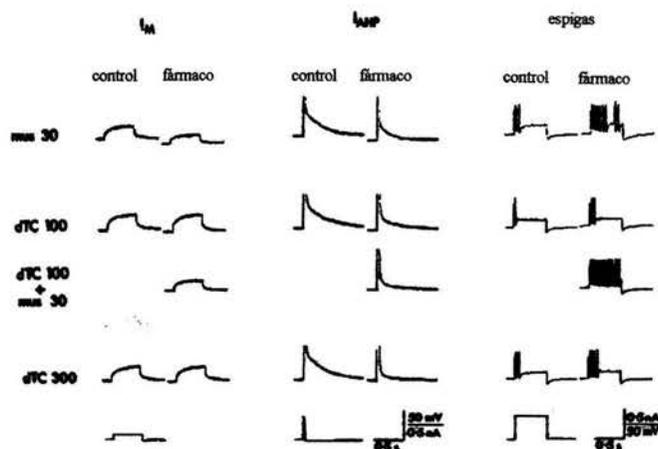
Una característica propia de las neuronas es que pueden adaptar o adecuar sus respuestas a los impulsos que reciben. Este proceso se manifiesta como una disminución en la duración de los trenes de espigas durante despolarizaciones prolongadas los cuales se reducen a

uno o pocos potenciales de acción. En muchos casos, esta adaptación se asocia con incrementos lentos en la conductancia al K^+ (cf. Connor y Stevens). Las células ganglionares de rana (Adams *et al.*, 1982b) y de rata (Brown *et al.*, 1982), las cuales exhiben una I_M prominente, también muestran una adaptación pronunciada durante despolarizaciones prolongadas.

La reducción o pérdida de la adaptación cuando se inhibió la I_M por agonistas colinérgicos en neuronas simpáticas de rana, llevó a proponer a la I_M como la única responsable de la adaptación. Sin embargo, en experimentos posteriores Tokimasa (1984) y Pennefather *et al.* (1985) reportaron que los agonistas colinérgicos también inhiben parcialmente a una corriente de K^+ activada por Ca^{2+} (I_{AHP}).

El grupo de Brown realizó experimentos similares en las SCGs de rata. Al igual que en el ganglio simpático de rana, encontraron que los agonistas colinérgicos como la muscarina o metacolina, además de inhibir a la I_M inhibieron con cierta variabilidad (0 a 50%) a la I_{AHP} (Brown, 1988).

Cuando se inhibió únicamente a la I_{AHP} con d-tubocurarina (alcaloide cuyo componente activo es el curare) la adaptación de las espigas se redujo; el número de espigas evocadas aumentó con inyecciones de corriente despolarizantes prolongadas. Estos efectos se obtuvieron únicamente a concentraciones de d-tubocurarina que inhibieron a más del 40 % de la I_{AHP} . Por el contrario, en presencia del Ba^{2+} o de la muscarina las espigas aumentaron dramáticamente a intensidades bajas de corrientes (Brown y Constanti, 1980). Por lo tanto, y como puede observarse en el esquema 5, en el ganglio simpático de rata, la I_M y la I_{AHP} ejercen efectos separados pero aditivos en la frecuencia de disparo.



Esquema 5 Efecto de la muscarina (mus) y de la d-tubocurarina (dTC) en fijación de corriente y en la frecuencia de disparos de las SCGs de rata. Los registros de corriente (columna de la izquierda y del centro) muestran trazos de la I_M y de las corrientes de cola de los canales de K^+ activadas por Ca^{2+} (I_{AHP}). La I_M se obtuvo durante pulsos despolarizantes de +10 mV de 0.5 ms desde un potencial de mantenimiento de -50 mV. La I_{AHP} se obtuvo durante pulsos despolarizantes de +50 mV de 40 ms desde un potencial de mantenimiento de -50 mV. Los registros de voltaje (columna derecha) muestran frecuencias de disparo obtenidas durante una inyección de corriente de +0.4 nA de 0.5 s a un potencial de membrana constante de -50 mV. La mus inhibió a la I_M y a la I_{AHP} , la dTC en cambio inhibió únicamente a la I_{AHP} . Con esta intensidad de corriente, la mus indujo más frecuencias de disparo, las cuales aumentaron en presencia de dTC (modificada de Brown, 1988).

3.4. FARMACOLOGÍA DEL CANAL M

3.4.1. Bloqueadores de la corriente M

El Ba^{2+} bloquea fuertemente la I_M a concentraciones de 1 a 4 mM (Adams *et al.*, 1982b; Constanti y Brown, 1981; Stansfeld *et al.*, 1993). Sin embargo, otros cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+}) no comparten este efecto. Los metales de transición Ni^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} la bloquean en menor grado en menor grado que el Ba^{2+} . El bloqueo de la I_M por Ba^{2+} no es sensible al voltaje y no altera la cinética del canal M. Se propone que el Ba^{2+} actúa directamente sobre el canal M desde el lado extracelular puesto que su efecto persiste cuando la entrada de Ba^{2+} a través de canales de Ca^{2+} se previene con Cd^{2+} (Constanti y Brown, 1981; Robbins *et al.*,

1992). Esto distingue el efecto del Ba^{2+} sobre la I_M de su efecto sobre corrientes de K^+ activadas por Ca^{2+} , en donde actúa de manera preferencial desde el lado intracelular (Hermann y Gorman, 1979) y en donde su efecto se previene cuando los canales de Ca^{2+} se bloquean (North y Tokimasa, 1983). El tetraetilamonio (TEA), un compuesto amino cuaternario, también bloquea desde el lado extracelular a los canales M nativos en las SCGs de rata (Wang *et al.*, 1998). El IC_{50} para el Ba^{2+} y el TEA es de 300 μM (Stansfeld *et al.*, 1993) y 5.8 mM (Adams *et al.*, 1982b; Wang *et al.*, 1998), respectivamente.

Básicamente se han descrito dos fármacos como bloqueadores selectivos del canal M, la linopiridina (DuP 996; 3,3-bis(4-piridinilmetil)-1-fenilindolin-2-ona) y el análogo de la linopiridina XE991 (10, 10-bis(4-piridinil-metil)-9(10 H)-antracena).

La linopiridina (Aiken *et al.*, 1995, 1996; Lamas *et al.*, 1997; Schnee y Brown, 1998), promotor de la cognición, aumenta la liberación de diversos neurotransmisores en el tejido cerebral por un mecanismo en el que el bloqueo del canal M parece ser clave (para revisión ver Aiken *et al.*, 1996). La linopiridina suprime completamente la I_M a una concentración de 30 a 100 μM . En cambio, los inhibidores de la I_M cuyo efecto inhibitorio está mediado por receptor, suprimen a la I_M en un máximo de un 80%. Esta observación junto con experimentos en los que la I_M se bloquea por linopiridina en presencia de tetrodotoxina (TTX) y atropina, sugiere que la linopiridina interactúa directamente con el canal (Aiken *et al.*, 1995).

Para explorar con más detalle esta posibilidad, Lamas *et al.*, (1997) estudiaron el efecto de la linopiridina en registros de canal unitario en parches escindidos de las SCGs de rata. Estos estudios mostraron un bloqueo rápido del canal M dependiente de la concentración. Se

sugirió un sitio extracelular de acción puesto que la linopiridina bloqueó al canal M unitario solo cuando se aplicó en el baño en registros en configuración *outside-out* (exterior hacia afuera), pero no en configuración *inside-out* (interior hacia afuera). Los registros en configuración *whole-cell* (célula completa) confirman esta suposición. La aplicación intracelular de la linopiridina en las SCGs de rata no modificó la amplitud basal de la I_M y tampoco antagonizó el bloqueo de la I_M cuando la linopiridina se aplicó en forma extracelular (Costa y Brown 1997).

El otro fármaco que bloquea selectivamente la I_M es el análogo de la linopiridina (Wang *et al.*, 1998; Zaczek *et al.*, 1998). El IC_{50} para el bloqueo del canal M en las neuronas simpáticas por linopiridina está en el rango de 3.4 a 7.0 μM (Costa y Brown, 1997; Lamas *et al.*, 1997). El compuesto relacionado XE991 tiene un IC_{50} de $0.98 \pm 0.15 \mu M$.

3.4.2. Activadores de la corriente M

El fármaco anticonvulsivo retigabina [D-23129; ácido N-(2-amino-4-(4-fluorobencilamino)-fenil) etil éster carbámico], sintetizado por primera vez en 1988, favorece la actividad del canal M en las SCGs de rata. Tatulian *et al.* (2001) observaron, en estas neuronas, el efecto de la retigabina sobre la I_M en registros en configuración de parche perforado durante pulsos despolarizante de voltaje de -70 a -10 mV desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. En ausencia de la retigabina, la activación de la I_M se manifestó por la aparición de una corriente saliente lenta dependiente del tiempo a partir de los -50 mV que se mantuvo en los potenciales más despolarizantes. En presencia de la retigabina la activación de la I_M se observó a partir de pulsos más negativos (-70 mV) y hubo un

aumento de la corriente total en todos los potenciales aplicados. Por lo tanto, la retigabina desplazó el umbral de activación de la I_M desde los ~ -50 mV hasta los ~ -80 mV ($V_{1/2} = -21$ mV). Este corrimiento se acompañó por un enlentecimiento de las corrientes de desactivación y por la aceleración en las corrientes de activación.

3.5. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CANAL M (KCNQ2/KCNQ3)

La naturaleza molecular de los canales M permanece oscura. Sin embargo, hace algunos años se propusieron (Bievert *et al.*, 1998; Charlier *et al.*, 1998; Kubisch *et al.*, 1999; Lerche *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 1998) a cuatro miembros de la familia de los canales de K^+ , KCNQ2-5 como posibles candidatos de la base molecular de los canales M. Estos genes se identificaron a partir de mutaciones que produjeron síndromes epilépticos en humanos, conocidos como convulsiones neonatales benignas (Bievert *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Charlier *et al.*, 1998), presumiblemente a causa de la hiperexcitabilidad neuronal. De manera interesante, las mutaciones en el primer miembro de esta familia de canales de K^+ , KCNQ1 (denominados formalmente $KvLQT1$), que de manera significativa disminuyen la actividad de las corrientes de K^+ cardiacas I_{Ks} , también producen un estado de hiperexcitabilidad en los miocitos cardiacos, que resultan en un síndrome de QT largo (Shalaby *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996).

¿Cuáles de las subunidades de los KCNQ forman la base molecular de la corriente M neuronal? La expresión heteróloga de las subunidades KCNQ2/KCNQ3 forma un canal selectivo a K^+ que exhibe propiedades biofísicas, una sensibilidad farmacológica y un patrón de expresión de genes esencialmente semejantes a las de los canales M nativos. El heterodímero

KCNQ2/KCNQ3 presenta una cinética de activación lenta, un umbral de activación más negativo (~ -60 mV) en comparación a otras corrientes de K^+ (Wang *et al.*, 1998) y una sensibilidad a la estimulación de receptores muscarínicos (Selyanko *et al.*, 2000; Shapiro *et al.*, 2000). Se mostró, además, que el heterodímero es sensible al bloqueo por los iones de Ba^{2+} , TEA, a los compuestos selectivos de linopiridina y XE991 (Wang *et al.*, 1998), y al anticonvulsivo retigabina que aumenta las corrientes (Main *et al.*, 2000; Rundfeldt y Netzer, 2000; Tatulian *et al.*, 2001; Wickenden *et al.*, 2000). Por otro lado, la coexpresión de las subunidades KCNQ2/KCNQ3 en distintas áreas del cerebro que incluyen el hipocampo, la neocorteza y el tálamo (Roche *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998; Tinel *et al.*, 1998; Cooper *et al.*, 2000); y su colocalización en el soma neuronal y en las dendritas (Cooper *et al.*, 2001) permite corroborar el papel dominante que juegan en el control de la excitabilidad neuronal (Jones *et al.*, 1995; Castaldo *et al.*, 2002).

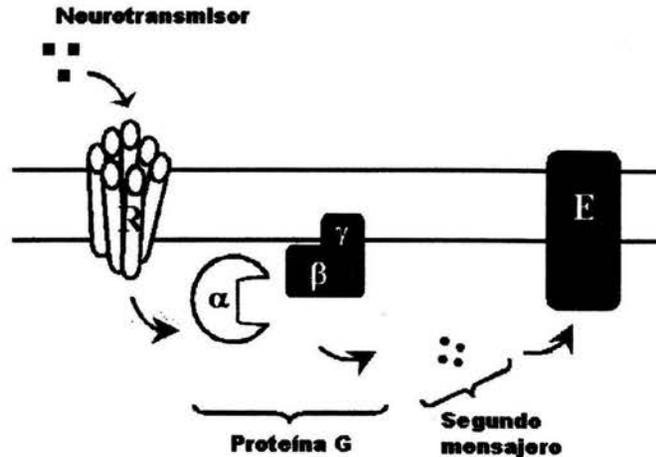
Los genes de las subunidades KCNQ2/KCNQ3 codifican para proteínas con seis segmentos transmembranales. En el cuarto segmento poseen una región altamente conservada rica en residuos de arginina, cargados positivamente, que funciona como el sensor del voltaje (hélice S4). Entre los segmentos 5 y 6 se encuentra un dominio denominado P que alberga el poro del canal con su secuencia característica para los canales de K^+ (GYG). También se caracterizan por tener una terminal carboxilo larga. Este último en los KCNQ2 tiene sitios de unión para varias moléculas reguladoras del canal como: el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) (Zhang *et al.*, 2003), la calmodulina (CaM) (Yus-Nájera *et al.*, 2002) y la proteína de anclaje de la proteína cinasa A (AKAP) (Hoshi *et al.*, 2003).

3.6. REGULACIÓN DE LA CORRIENTE M MEDIADA POR RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G

La vía de regulación de la I_M , mediada por receptores heptahelicales acoplados a proteínas G ha sido intensamente estudiada.

Adams, Brown y sus colegas (Adams *et al.*, 1982b; Adams *et al.*, 1983) encontraron en las SCGs de rana toro que la I_M además de regularse por la muscarina, se regula por otra serie de sustancias neuroactivas (Hille, 1994) como son la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), y por receptores purinérgicos y β -adrenérgicos (Adams *et al.*, 1982b). En las SCGs de rata, la I_M además de ser regulada por agonistas muscarínicos (Marrion, 1993; Shapiro *et al.*, 2001), es regulada por la angiotensina II (Shapiro *et al.*, 1994) y por la bradicinina (BC) (Jones *et al.*, 1995). El primer paso involucrado en la regulación del canal M por estos agonistas es la activación de una proteína G.

Estas proteínas son heterotrímeros, formados por las subunidades α , β y γ . Las subunidades α se clasifican, dependiendo de si son sensibles a la toxina pertusis (PTX), la toxina del cólera o a ninguna de estas toxinas. La proteína G que se activa en esta vía de regulación es insensible a la PTX (Brown *et al.* 1989; Jones *et al.* 1995; Villarroel, 1996). El efecto más reproducible de estos agonistas es la inhibición de la I_M con un retardo marcado y este efecto es insensible al voltaje (ver esquema 6).



Esquema 6 Vía de regulación en la que interviene un segundo mensajero difusible. Un receptor heptahelical acoplado a proteínas G insensibles a la toxina pertusis regula al canal M (E) en forma indirecta mediante la activación una cascada de segundos mensajeros.

En relación al retardo marcado de la inhibición de la I_M , Adams y Brown (1982) observaron una latencia de ~ 100 ms entre el potencial postsináptico excitatorio rápido y el potencial postsináptico excitatorio lento que resulta de la liberación de ACh al espacio sináptico. En primera instancia Adams *et al.* (1986) propusieron que la latencia podía deberse a la difusión de ACh en el espacio sináptico para alcanzar los receptores muscarínicos localizados en regiones más distantes de la membrana. Sin embargo, Villarroel (1996) con el uso de un sistema de perfusión rápido que permite el intercambio de la solución en < 150 ms y un tiempo preciso de la aplicación del agonista (Villarroel, 1994), encontró que la latencia no se acortaba. Estos resultados indicaron que dicha latencia no se debía a la distancia entre el sitio de liberación y los receptores muscarínicos. La observación posterior de que la inhibición de la I_M se mantiene aun habiéndose quitado el agonista del baño, alcanzando su máximo 4.5 s más tarde sin importar la duración del estímulo (0.5 a 10 s); sugirió la acumulación rápida de un segundo mensajero como respuesta a la muscarina (Villarroel, 1996).

El curso temporal lento de esta corriente y el retardo (<500 ms) marcado de su inhibición apoyó la hipótesis de que este mensajero requiere un tiempo para difundir en el citoplasma (Hille 1994; Marrion, 1997, Villarroel, 1996). Otra evidencia que favoreció la existencia de un segundo mensajero difusible desconocido fue la observación de que la inhibición del canal M por agonistas muscarínicos o por BC cuando se aplican en forma extracelular en las SCGs de rata (Selyanko *et al.*, 1992) o de rana (Marrion, 1993) es que se observó en registros en configuración de parche perforado pero no en registros en configuración *outside out* Stansfeld *et al.*, 1993).

**3.6.1. Vía principal de señalización que inhibe a la corriente M:
surgimiento de la hipótesis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
como segundo mensajero**

La participación del receptor muscarínico en la inhibición de la I_M ha sido intensamente estudiado con el fin de ahondar sobre la regulación del canal M por el segundo mensajero. A pesar de que el esclarecimiento del mecanismo de regulación de la I_M permanece controvertido (Delmas *et al.*, 2004; Shapiro, 2004) diversas evidencias (Bernheim *et al.*, 1992; Hamilton *et al.*, 1997; Marrion *et al.*, 1989) dejan claro que la estimulación muscarínica activa al receptor muscarínico del tipo M_1 (M_1AChR) en las SCGs. La existencia de otros subtipos de receptores muscarínicos (M_2 - M_5) en estas neuronas (Dorje *et al.*, 1991), llevaron a Hamilton *et al.* (1997) en una primera instancia a examinar el papel del receptor M_1 en la inhibición de la I_M por la vía muscarínica. Encontraron que en las SCGs de ratones deficientes del gen $m1$ se perdía completamente la inhibición de la I_M por muscarina. Así mismo, la inhibición de la I_M se anuló en presencia del bloqueador selectivo del receptor M_1 , pirenzepina, y no en presencia de los antagonistas selectivos de M_2 y M_2/M_4 , galamina o himbacina respectivamente.

De manera específica, se propone que la subunidad α de las proteínas Gq media el efecto muscarínico sobre la I_M (Haley *et al.*, 1998). La microinyección selectiva de anticuerpos específicos para las $G_{\alpha q/11}$, a diferencia de la microinyección de anticuerpos específicos para la $G_{\alpha o}$, redujo la inhibición de la I_M por Oxo-M en las SCGs (Caulfield *et al.*, 1994). Berstein *et al.*, (1992) mediante la reconstitución del M_1AChR , las proteínas $G_{q/11}$ y la $PLC\beta_1$ en vesículas lipídicas muestran que estas proteínas son suficientes para activar la vía de señalización hormonal IP_3/DAG . Así mismo, Wu *et al.*, (1992), con la técnica de la cotransfección, muestran el acoplamiento funcional de las proteínas $G_{\alpha 11}$ y $G_{\alpha q}$ a las $PLC\beta_1$ en las células COS-7. Más tarde, Delmas *et al.*, (1998) y Haley *et al.*, (1998) reportaron que el M_1AChR acopla a la familia de las $G_{q/11}$ de las proteínas G insensibles a la PTX. Experimentos de reconstitución (Fletcher *et al.*, 1998; Lindorfer *et al.*, 1998) indican que el complejo $G\beta_5\gamma$ interactúa en forma selectiva con receptores acoplados a las proteínas $G_{\alpha q}$ a través de la asociación de las proteínas $G\beta_5$ con $G_{\alpha q}$. Maier *et al.* (2000), proponen que el dímero $G\beta_5\gamma_2$, coexpresado y purificado de las células Sf9, estimula a la $PLC\beta_1$.

Para determinar la porción específica de la $PLC-\beta_1$ que se requiere para su activación por proteínas $G_{\alpha q}$, Wu *et al.* (1993) transfectaron en las células COS-7 el DNAC de la $PLC-\beta_1$ con supresiones específicas en su terminal carboxilo. Estos experimentos sugieren que la secuencia de los aminoácidos de la terminal carboxilo de la $PLC-\beta_1$ que se requiere para la activación de la $G_{\alpha q}$ está integrada por un número considerable de residuos cargados, específicamente básicos. Esta región es la más rica en residuos de lisina de toda la molécula. Otros experimentos que conjugan la biología molecular con modelos dinámicos moleculares (Ilkaeva *et al.*, 2002; Singer *et al.*, 2002) corroboraron la participación de aminoácidos

cargados en la terminal carboxilo para la activación de las proteínas $G_{\alpha q}$. Estos resultados se confirmaron con la observación de que la liberación de fosfatos de inositol se inhibió considerablemente cuando se coexpresó la porción truncada de la terminal carboxilo de la $PLC\beta_1$ con el M_1AChR en las células COS-7 (Wu *et al.*, 1993).

Los datos de la literatura indican que la inhibición de la I_M no se debe a una interacción directa entre el canal y la proteína G, como es el caso de la activación de los canales de K^+ GIRK (Zhang *et al.*, 1999) o de la inhibición de los canales de Ca^{2+} neuronales (Hille, 1994), sino a la participación de un segundo mensajero intracelular (Selyanko *et al.*, 1992).

La relación típica entre el M_1AChR , la fosfolipasa C (PLC) y la hidrólisis de los fosfoinosítidos (Lee y Rhee, 1995), llevó a proponer a la proteína cinasa C (PKC) o el Ca^{2+} intracelular como el segundo mensajero primario en la regulación de la I_M (Beech *et al.*, 1991; Hille, 1994). A pesar de estas suposiciones, existen datos que sugieren que ninguno de estos mensajeros es la señal primaria para la inhibición muscarínica de la I_M (Brown *et al.*, 1997): la activación o el bloqueo farmacológico de la PKC no altera la regulación de la I_M (Marrion, 1994); de hecho, los agonistas muscarínicos no alteran la $[Ca^{2+}]_i$ en las neuronas simpáticas, las cuales han sido el modelo de estudio en la mayoría de estos trabajos (Beech *et al.*, 1991).

La mayor confusión en la búsqueda del segundo mensajero que regula a la I_M , se originó a partir de la interpretación de algunos experimentos que sugirieron que el mensajero era difusible. El grupo de Soejima y Noma (1984) realizaron uno de los primeros experimentos; ellos estudiaron la regulación de los canales de K^+ regulados por proteínas G en miocitos

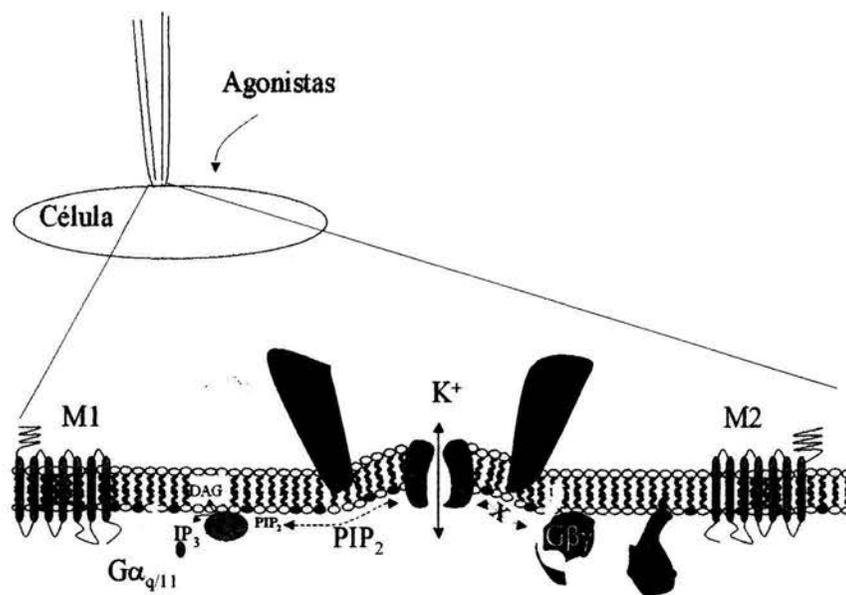
atriales. Encontraron que estos canales se activan directamente por las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G (Logothetis *et al.*, 1987).

En los experimentos de Soejima y Noma (1984), la aplicación en el baño del agonista no regula a los canales aislados en el parche en configuración de *cell-attached* (adosado a la célula). Por el contrario, la aplicación del agonista a través de la pipeta resultó en una activación robusta del canal. Estos resultados dieron origen a la noción de la señalización delimitada a la membrana y ofreció un modelo para distinguir entre las señalizaciones que involucran un segundo mensajero difusible de otras confinadas a la membrana plasmática. Por analogía, la aplicación al baño de agonistas muscarínicos sí inhibe a la I_M en registros en configuración de *cell-attached* (Marrion, 1993; Selyanko *et al.*, 1992). Estos resultados se han utilizado como evidencia para evaluar la participación de un segundo mensajero citosólico. El planteamiento era que en un mecanismo mediado por un mensajero, el agonista aplicado en el baño actúa sobre múltiples receptores para dar lugar a un mensajero que difunde hasta los canales contenidos en el parche y regulan su función. Por otro lado, en el mecanismo delimitado a la membrana, no existe un mensajero difusible, y por lo tanto, los canales contenidos en el parche no se modulan por el agonista aplicado en el baño. El experimento también supone que las proteínas G activadas no pueden difundir fácilmente a través del sello de la pipeta en el plano de la membrana.

Posteriormente, la dependencia funcional de la señalización por proteínas G del PIP_2 (Sui *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998) sugirió la existencia de distintas vías de señalización delimitadas a la membrana. Lo que en el experimento de Soejima y Noma (1984) se consideró como un ejemplo del mecanismo clásico delimitado a la membrana, es ahora visto como un ejemplo de un mecanismo análogo al observado en las vías de señalización en las que

participan segundos mensajeros solubles. Pero, el PIP_2 actúa como un segundo mensajero que difunde en la parte interna de la membrana, en lugar de en el citoplasma.

Para valorar si las conclusiones obtenidas para la señalización por proteínas (i.e. $\text{G}\beta\gamma$) en los experimentos de Soejima y Noma se aplican a la señalización por PIP_2 , el grupo de Logothetis (Zhang *et al.*, 2003) realizó los experimentos análogos a la inhibición de la I_M en ovocitos expresados con los canales GIRK4 y con el M_1AChR en registros de macroparche en configuración *cell-attached*. En estos experimentos la aplicación de ACh al baño produjo una inhibición de las corrientes GIRK. Se ha mostrado que el PIP_2 interactúa directamente con estos canales (e.g., Zhang *et al.*, 1999) y se inhiben por la estimulación de la PLC y la consecuente hidrólisis del PIP_2 (e.g. Kobrinsky *et al.*, 2000). El PIP_2 se encuentra confinado en la parte interna de la bicapa lipídica y su movilidad a través del sello de la pipeta, el cual se establece en la parte exterior de la bicapa lipídica, se encuentra más bien intacta en un experimento en configuración *cell-attached*. Es por ello, que la aplicación de ACh en el baño (fuera del parche) inhibió la actividad de los canales (contenidos en el parche). Esto sugiere que la hidrólisis de PIP_2 como consecuencia de la activación de la PLC, en la membrana en la parte exterior del parche dispara (desencadena) una reducción en el PIP_2 dentro del parche, muy posiblemente por difusión lateral del PIP_2 siguiendo el gradiente de concentración del PIP_2 a través de la pipeta de registro. Estos datos sugieren que el segundo mensajero difusible podría estar delimitado a la membrana y que la difusión del PIP_2 a través de la pipeta de registro durante la aplicación del agonista, que provoca la hidrólisis del PIP_2 fuera de la pipeta es un posible mecanismo (ver esquema 7).



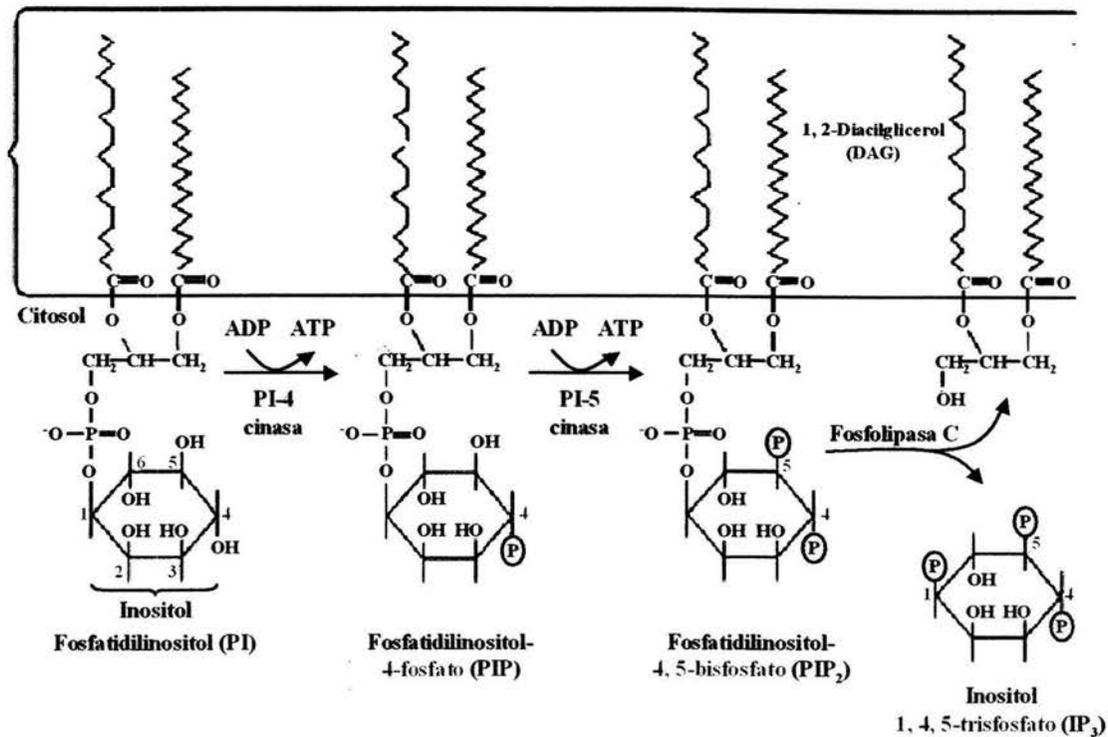
Esquema 7 Ilustración del experimento de Soejima y Noma (1984). La difusión de las subunidades $G\beta\gamma$ se interrumpe por la pipeta de registro, sin embargo la difusión del PIP_2 continúa, posiblemente debido a que la pipeta de registro no constriñe el lado interno de la membrana (modificada de Zhang *et al.*, 2003).

Posteriormente y con la propuesta realizada en años anteriores (Wang *et al.*, 1998; Selyanko *et al.*, 1999; Shapiro *et al.*, 2000) de que los canales de K^+ KCNQ2/KCNQ3 forman la base molecular del canal M nativo se realizaron varios experimentos (Suh y Hille, 2002; Winks *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003) para valorar la participación del PIP_2 en estos canales. Suh y Hille (2002) muestran, en el canal M y en su correlato molecular, que la inhibición mediada por receptor es irreversible cuando se bloquea, por inhibidores de cinasas lipídicas, el reciclaje de PIP_2 , el cual es sensible a los agonistas que activan a la PLC. La recuperación de la I_M de la inhibición por muscarina requiere de la fosforilación de lípidos mediante la fosfatidilinositol-4-cinasa (PI4-cinasa). Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la amplitud de las corrientes KCNQ2/KCNQ3 reflejan los niveles de PIP_2 en la membrana. Zhang *et al.* (2003) proponen que el PIP_2 interactúa en forma electrostática y directa con un residuo de histidina de la terminal C próxima al extremo citosólico del último dominio transmembranal (S6) de los canales KCNQ. Las mutaciones de este residuo de histidina

disminuyen significativamente la sensibilidad de los canales al PIP_2 resultando en canales silentes.

3.6.2. Biosíntesis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

En la biosíntesis del fosfatidilinositol, catalizada por la cinasa de fosfatidilinositol, interviene el CDP-diacilglicerol y el L-mio-inositol. El fosfatidilinositol (PI) sufre dos fosforilaciones sucesivas para dar fosfatidilinositol 4-fosfato (PI-4) y PIP_2 . El PIP_2 , constituye una forma de almacenamiento de dos segundos mensajeros, el 1,2-diacilglicerol (DAG) y el 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3). Cuando se activa un receptor acoplado a la proteína $G_{q/11}$, esta proteína acopla al receptor a un grupo de enzimas conocidas como $PLC\beta$ que pertenece a una familia más grande de fosfolipasas, todas las cuales tienen como sustratos a fosfolípidos de inositol. La ocupación del receptor por un agonista activa a la proteína G que a su vez se fija a la fosfolipasa en la superficie interior de la membrana plasmática. Una vez activada, la lipasa desdobla rápidamente el PIP_2 a IP_3 y DAG. Si la PLC se encuentra activa durante largo tiempo, varios fosfoinosítidos de la membrana (como PIP_2 y PI-4) se agotan más rápido de lo que son regenerados (Willars *et al.*, 1998). La disminución de los fosfoinosítidos que se encuentran en la membrana se lleva a cabo en varios segundos. Como se muestra en el Esquema, la generación de PIP_2 requiere una serie de pasos que incluyen la fosforilación del fosfatidilinositol en la posición 4 y 5 del inositol mediante cinasas lipídicas. La regeneración de las formas fosforiladas puede tomar varios minutos. Estas cinasas lipídicas requieren de altas concentraciones de ATP (~1 mM) para su máxima actividad.



Esquema 8 Biosíntesis de los fosfoinosítidos. Cada cinasa de fosfatidilinositol unida a la membrana coloca un fosfato en un grupo hidroxilo específico del anillo de inositol, produciendo los fosfoinosítidos PIP y PIP₂. El rompimiento de PIP₂ por la PLC lleva a la formación de IP₃ y DAG (modificada de Lodish *et al.*, 2000).

3.7. REGULACIÓN DE LA CORRIENTE M POR CALCIO

Desde el descubrimiento de la I_M el papel que tiene el Ca^{2+} en la regulación de la I_M ha estado en discusión. Originalmente se pensaba que la I_M era “independiente del Ca^{2+} ” en el sentido de que no requería del influjo de Ca^{2+} para su activación (Adams *et al.*, 1982a) como lo requieren otras corrientes de K^+ como la I_c (Adams *et al.*, 1982c) y la I_{AHP} (Pennefather *et al.*, 1985). La I_M en las SCGs de rana (Adamas *et al.*, 1982b) y rata (Marrion *et al.*, 1989) persiste cuando se previene la entrada del Ca^{2+} , quitando el Ca^{2+} de la solución extracelular o utilizando antagonistas de canales de Ca^{2+} . Sin embargo, en relación a la actividad basal, la conductancia máxima en las neuronas simpáticas de rana se redujo en un 60% cuando se quitó el Ca^{2+} de la

solución extracelular (Tokimasa y Akasu, 1990) y fue favorecida por la aplicación intracelular de CaM (Akasu y Tokimasa, 1992). La diálisis del quelante de Ca^{2+} , BAPTA suprimió a la I_M en forma gradual (Munakata y Akaike, 1993). Además, la adición de cafeína, la cual provoca la liberación de Ca^{2+} de los reservorios sensibles a cafeína, bloquea (Pfaffinger *et al.*, 1988; Akaike y Sadoshima, 1989), aumenta (Pfaffinger *et al.*, 1988; Akaike y Sadoshima, 1989; Marrion y Adams, 1992; Robbins *et al.*, 1992) o evoca a la I_M en neuronas simpáticas de rana (Kuba, 1980; Koketsu *et al.*, 1982; Pfaffinger *et al.*, 1988). Estos resultados se pueden explicar con datos posteriores que sugieren que el Ca^{2+} tiene un efecto doble sobre la I_M (Tokimasa, 1985; Marrion *et al.*, 1991; Kirkwood *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1994): Marrion *et al.* (1991), utilizando la fotólisis de un quelante de Ca^{2+} o evocando potenciales de acción, demostró que pequeños aumentos en el Ca^{2+} (50 a 140 nM) aumentaron la I_M , y aumentos en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) mayores y más duraderos suprimieron a la I_M . Estos datos concuerdan con observaciones previas de que la I_M se reduce tras aumentos amplios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, producidos por una espiga de Ca^{2+} (Tokimasa, 1985).

La modulación de la I_M por neurotransmisores se acompaña frecuentemente por un aumento perceptible en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Pfaffinger *et al.*, 1988; Marrion *et al.*, 1991). Varios investigadores han utilizado el BAPTA para examinar la mediación de los cambios transitorios y estables en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la modulación de la I_M inducida por agonistas. Kirkwood *et al.*, (1991) mostraron que la diálisis de 20 mM de BAPTA o la depleción de los reservorios internos de Ca^{2+} redujeron la respuesta de la I_M a los agonistas muscarínicos. Se sugirió que la supresión muscarínica de la I_M estaba mediada por la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares debidos a la producción de IP_3 (Kirkwood *et al.*, 1991). La recuperación de la I_M , posterior al lavado del agonista (sobre-recuperación), también se bloqueó por la diálisis de 20 mM de BAPTA. Este resultado indica que esta última fase de la respuesta de igual forma

resulta del Ca^{2+} liberado de los reservorios intracelulares sensibles a IP_3 (Marrion *et al.*, 1991). De manera más específica, la inhibición de la I_M y la inducción de la sobre-recuperación se atribuyeron a los niveles sostenidos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; pero no a un aumento transitorio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Mediante el uso de registros en configuración de célula completa combinados con la perfusión intracelular e imágenes de Ca^{2+} en la misma preparación, Yu *et al.* (1994) demostraron que la inhibición de la I_M por muscarina o LHRH ocurrió en forma dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$: a mayores niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se observó una mayor inhibición de la I_M . Una solución interna de cerca de 0 Ca^{2+} bloqueó la sobre-recuperación de la I_M después del lavado de los agonistas. Sin embargo, la sobre-recuperación se desarrolló con una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ normal de 120 nM aun en presencia de 20 mM de BAPTA en la solución interna. Estos resultados sugieren que la sobre-recuperación de la I_M no depende del aumento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La conductancia máxima del canal M se duplicó al aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ desde 0 a 120 nM y la curva de activación de la I_M se corrió hacia valores negativos. A medida que se aumentó la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 120 a 240 nM, la constante de tiempo de la desactivación (τ_d : a -50 mV) y de la activación (τ_a : a -30 mV) aumentó. Este aumento modesto en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por lo tanto llevó a un aumento en el estado estable de la I_M en todos los potenciales en el rango de su activación. Un aumento posterior en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a 450 nM resultó en una reducción en la τ_d , τ_a y en la conductancia del estado estable. Por lo tanto el nivel de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ determina el tamaño de la I_M .

En reportes previos, Beech *et al.* (1991) mostraron en las SCGs de rata que aunque la estimulación muscarínica inhibió a la I_M sin la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el BAPTA (11-12 mM) redujo significativamente dicha inhibición, disminuyendo los niveles de reposo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En un estudio posterior (Kurenyi *et al.*, 1997) se observó que la muscarina a bajas

concentraciones (10-30 nM) no inhibió a la I_M , sino que la aumentó en un 25% en neuronas simpáticas de rana. La muscarina (10 nM) desplazó la curva de activación hacia la derecha sin ningún efecto aparente en la conductancia máxima, sin embargo la τ_d aumentó desde 111 hasta 135 ms. Con la técnica de fluorimetría no se logró apreciar un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$; sin embargo, la similitud de los efectos con los vistos en un aumento modesto (~52 nM) en la $[Ca^{2+}]_i$ (Marrion *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1994) sugieren que el efecto facilitado de muscarina a bajas concentraciones podría estar mediada por un aumento modesto (~52 nM) en un compartimiento de la submembrana. Estos resultados indican que la I_M está bajo un control muy fino de la $[Ca^{2+}]_i$ la cual se requiere para la inhibición muscarínica de los canales M (Pfaffinger *et al.*, 1988; Beech *et al.*, 1991; Marrion *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1994).

El papel permisivo que tiene la $[Ca^{2+}]_i$ en la facilitación de la inhibición muscarínica de la I_M también se ha propuesto en experimentos realizados a 0 y 2 mM de Ca^{2+} extracelular en las neuronas simpáticas (Lamas, 1999). Del mismo modo, la observación en las neuronas de los de rana, de que la aplicación del antagonista de IP_3 heparina disminuyó significativamente la sobre-recuperación de la I_M pero no afectó la inhibición de la I_M inducida por muscarina (Chen *et al.*, 1993) implica que la $[Ca^{2+}]_i$ podría estar controlada por reservorios de Ca^{2+} separados que tienen distintos roles en la supresión muscarínica, y en la sobre-recuperación de la I_M .

La conclusión de que la inhibición muscarínica de la I_M no depende de un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ se confirmó en células tsA-201 transfectadas con los genes del canal M KCNQ2/KCNQ3 (Shapiro *et al.*, 2000). La Oxo-M inhibió significativamente a las corrientes KCNQ2/KCNQ3 heteroméricas cuando la $[Ca^{2+}]_i$ se fijó a ~150 nM (20 mM BAPTA más 10 mM Ca^{2+} en las pipetas de registro). La inhibición fue menor cuando únicamente se incluyó 20

mM de BAPTA en la solución interna. Estos datos apoyan la sugerencia de que se requiere una mínima cantidad de $[Ca^{2+}]_i$ para que se pueda llevar a cabo la regulación de la I_M por la vía muscarínica.

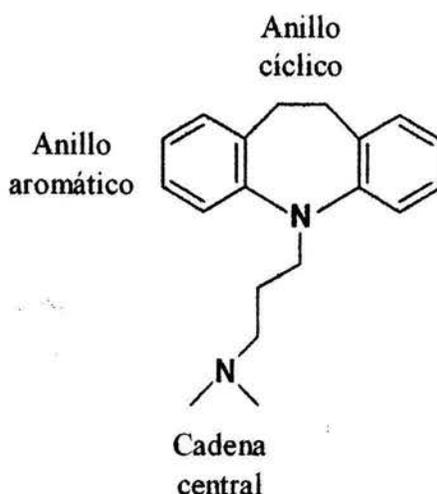
3.8. OTRAS VÍAS DE REGULACIÓN DE LA CORRIENTE M

Los efectos de la activación del receptor de bradicinina (B_2R) también han sido estudiados con el propósito de ahondar sobre la modulación del canal M. El esquema 9 resume el trabajo realizado por varios laboratorios con el fin de dilucidar esta vía. La BC activa al receptor de BC (B_2R), que al igual que el M_1AChR se encuentra acoplado a la proteína $G_{q/11}$ (Caulfield *et al.*, 1994). El agonista del receptor M_1 no aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ e inhibe consistentemente a la I_M con la $[Ca^{2+}]_i$ fijada, los receptores de IP_3 bloqueados o con la depleción de los reservorios internos de Ca^{2+} (Brown *et al.*, 1989; Cruzblanca *et al.*, 1998; Shapiro *et al.*, 2000). Se ha acumulado evidencia considerable de que la depleción de PIP_2 es central para estas acciones (Ford *et al.*, 2003; Suh *et al.*, 2004; Suh y Hille, 2002; Winks *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003). Sin embargo la BC, que también inhibe a los canales M, aumenta la $[Ca^{2+}]_i$. Su acción se interrumpe bajo cualquiera de los efectos arriba mencionados (Cruzblanca *et al.*, 1998). Se piensa que la inhibición por BC está mediada por los iones de Ca^{2+} , liberados de reservorios, que se unen a la CaM, la cual actúa como el sensor del Ca^{2+} del canal. Por lo tanto, la sobre-expresión en las neuronas de una CaM negativa dominante, que no se puede unir al Ca^{2+} , interrumpió la regulación por BC, pero no tuvo ningún efecto en la acción muscarínica; y en un sistema reconstituido, la CaM se requirió para que los canales KCNQ fueran sensibles a Ca^{2+} (Gamper y Shapiro, 2003). Además, la regulación de algunas de las subunidades KCNQ

3.9. ACCIONES CLÁSICAS DE LOS ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS

La mayoría de los antidepresivos ejercen sus acciones primarias sobre el metabolismo de los neurotransmisores monoaminérgicos y sus receptores. De manera particular, los antidepresivos tricíclicos (ATC) como la imipramina (IMI) y sus derivados inhiben la recaptura de norepinefrina (NE) (Horn *et al.*, 1971) y el transporte de serotonina (5-HT) (Barbaccia *et al.*, 1983) en las terminales nerviosas. Se ha propuesto que los ATC se unen a ciertos sitios de reconocimiento en las células y de esa forma afectan la recaptura de 5-HT y NE (Marcusson *et al.*, 1986). También son antagonistas de los receptores α -adrenérgicos (Nomura *et al.*, 1987), histaminérgicos (Green y Maayani, 1977; Richelson, 1978) y colinérgicos (Somogyi y Perel, 1989; Golds *et al.*, 1980; Nomura *et al.*, 1987).

La IMI, fue uno de los primeros antidepresivos sintetizados en los años 40's que desde principios de los 60's, ha sido ampliamente usada para el tratamiento de la depresión. Debido a su estructura química, este compuesto se refiere frecuentemente como "antidepresivo tricíclico". Como se muestra en el esquema 10, la estructura de la IMI está compuesta por tres anillos característicos, dos anillos aromáticos y uno cíclico, donde el heteroátomo es un nitrógeno. La molécula tiene otro nitrógeno en la cadena central que está separado del primer nitrógeno por tres carbonos.



Esquema 10 Estructura química de la imipramina. Está formada por un anillo central, dos aromáticos y una cadena central.

4.0. ACCIONES DE LOS ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS SOBRE LOS CANALES IÓNICOS

Aunque está bien establecido que la IMI y los ATC relacionados potencian la acción de las aminas biogénicas mediante el bloqueo de su inactivación fisiológica, transporte o recaptura, en las terminales nerviosas (Horn *et al.*, 1971; Barbaccia *et al.*, 1983), existen evidencias que sugieren que pueden actuar sobre canales iónicos. Bennett y Middleton (1975) por ejemplo, reportaron que el ATC desipramina prolonga el potencial de acción preterminal de las neuronas simpáticas de rata mediante un mecanismo que no parece involucrar las acciones clásicas del ATC, es decir, la captura de las catecolaminas. Estas, acciones sin embargo, podrían explicarse mediante el bloqueo de las corrientes de K^+ . Más específicamente, se ha mostrado que la IMI actúa sobre una variedad de canales iónicos: canales de K^+ cardiacos (Delpon *et al.*, 1992; Valenzuela *et al.*, 1994), neuronales dependientes de voltaje (Ogata *et al.*, 1989; Woollorton y Mathie, 1993, 1995; Kuo 1998), activados por Ca^{2+} (Dreixler *et al.*, 2000;

Terstappen *et al.*, 2001; Gavrilova-Ruch *et al.*, 2002), canales EGL-2 (Weinshenker *et al.*, 1999), hERG (Teschemacher *et al.*, 1999), hEAG1 (García-Ferreiro *et al.*, 2004); canales de Na⁺ cardiacos (Ogata y Narahashi, 1989; Habuchi *et al.*, 1991) y neuronales (Ogata *et al.*, 1989; Yang y Kuo, 2002); y canales de Ca²⁺ (Ogata *et al.*, 1989; Choi *et al.*, 1992). La IMI inhibe estos canales iónicos con un IC₅₀ en el rango de 1 a 30 μM y la curva concentración-respuesta se ajusta a un coeficiente de Hill cercano a 1.

En la familia de los canales de K⁺ hay una fuerte evidencia de que la IMI bloquea a los canales I_A en miocitos atriales (Delpon *et al.*, 1992; Casis y Sánchez-Chapula, 1998) y en neuronas de hipocampo (Kuo, 1998) por un mecanismo de bloqueo de canal abierto similar al descrito para los canales Ether à go-go (Eag) (García-Ferreiro *et al.*, 2004). Sin embargo, contrario a lo propuesto para los canales Eag, Kuo (1998) sugiere que la IMI bloquea a los canales I_A en su forma no cargada y que el sitio de unión está localizado en el lado extracelular del canal. Wooltroton y Mathie (1993, 1995), quienes analizaron el efecto de varios antidepressivos tricíclicos sobre la I_A de neuronas simpáticas de rata, también propusieron la existencia de un sitio de unión externo con una alta afinidad para la forma no cargada de estos fármacos. García-Ferreiro *et al.* (2004), por el contrario, sugieren que la IMI permea la membrana e inhibe a los canales Eag mediante su unión selectiva al canal abierto. Proponen que la IMI cruza la membrana en su forma no cargada y que actúa desde el interior en su forma cargada en un sitio localizado cerca de la parte interna del filtro de selectividad, desde donde compete con el TEA intracelular pero no extracelular.

Por otro lado, Teschemacher *et al.* (1999) reportaron que el bloqueo por IMI de los canales HERG transfectados en las células CHO bloquea estos canales tanto en estados cerrados como abiertos. Las observaciones de Teschemacher *et al.* (1999) de que el bloqueo del

canal heterólogo no altera dramáticamente la cinética de los I_{HERG} , y que el bloqueo es relativamente independiente del voltaje, están en concordancia con la observación del bloqueo del componente sostenido del I_{KV} por ATC realizadas en el ganglio simpático (Wooltorton y Mathie, 1993).

Estos datos indican que la IMI inhibe a las corrientes de K^+ a través de diferentes formas.

4.1. LOS ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS Y SISTEMAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

De manera interesante, los ATC también promueven la actividad de sistemas de señalización intracelular en diversos tipos celulares. Joshi *et al.* (1999) examinaron el efecto de los ATC amitriptilina y desipramina en la señalización del Ca^{2+} en líneas celulares de origen neuronal. Para estudiar el mecanismo involucrado en la movilización del Ca^{2+} , utilizaron agentes farmacológicos que inhiben la formación de IP_3 en las células y bloqueadores de los canales de Ca^{2+} . Ellos proponen, en concordancia con Shimizu *et al.* (1993) que ambos fármacos liberan Ca^{2+} desde los reservorios sensibles a IP_3 mediante la activación de la PLC. Otros investigadores demuestran que altas concentraciones de ATC estimulan la formación de fosfatos de inositol marcados con H^3 en rebanadas de corteza cerebral de rata. Fukuda *et al.* (1994) en un estudio bioquímico, examinaron el efecto de ATC (IMI, desipramina y amitriptilina) sobre la actividad de la PLC. Encuentran que la IMI estimula la actividad de la PLC tanto en el citosol como en la membrana de células de corteza frontal de rata. La preincubación en el citosol con el anticuerpo anti-PLC β 1 previno la activación de la PLC

mediada por IMI. Sin embargo, la preincubación del citosol con el anticuerpo anti-PLC γ 1 o anti PLC δ 1 no previno la activación de la PLC. Estos resultados sugieren que la IMI activa a la PLC β 1 directamente sin la participación de receptores o la mediación de proteínas de nucleótidos de guanina. Posteriormente, Cadiou y Molle (2003) utilizan a la IMI para determinar si los cilios olfativos de pescado (carpa) contiene una PLC funcional. Estos resultados descartan la posibilidad de que los efectos de los ATC y en particular de la IMI sean exclusivos sobre receptores de membrana o transportadores de neurotransmisores.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tras varios años de investigación realizados principalmente en líneas celulares transfectadas con las subunidades KCNQ2/KCNQ3, se ha propuesto que el PIP₂ regula la actividad de varios canales (Ford *et al.*, 2003; Hilgemann y Ball, 1996; Loussouarn *et al.*, 2003) y transportadores (Hilgemann y Ball, 1996). En el caso de la regulación del canal M, la hipótesis propone que la reducción en la concentración de PIP₂, como ocurriría después de la activación de la PLC (Willars *et al.*, 1998), es la responsable del cierre de estos canales inducido, y por lo tanto, de su inhibición inducida por agonistas (Suh *et al.*, 2004; Suh y Hille, 2002; Winks *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003). De este modo, se ha mostrado que la inhibición de la I_M mediada por receptores muscarínicos es irreversible cuando el reciclaje de las reservas de PIP₂ sensibles a agonistas se bloquea por inhibidores de cinasas (Suh y Hille, 2002).

De manera interesante, los ATC como la IMI ejercen una variedad de acciones tanto sobre receptores de membrana, como en la inhibición de la recaptura de neurotransmisores en las terminales aminérgicas. A través de este último mecanismo, aumentan la disponibilidad de los niveles de neurotransmisores y restablecen el balance de éstos en el sistema nervioso. Sin embargo, también se ha mostrado que la IMI actúa sobre una variedad de canales iónicos. Estudios bioquímicos han revelado que la IMI y fármacos derivados son capaces de activar substratos intracelulares (Shimizu *et al.*, 1993; Fukuda *et al.*, 1994; Joshi *et al.*, 1999; Cadiou y Molle, 2003), lo cual descarta la posibilidad de que sus efectos sean exclusivos sobre receptores de membrana o transportadores de neurotransmisores con efectos a largo plazo.

La I_M es relevante por su papel en la regulación de la excitabilidad celular y podría ser otro blanco de estos fármacos. Esta corriente al reducirse aumenta generalizadamente la

excitabilidad, lo cual se traduce en un incremento en el patrón de disparo de potenciales de acción en las neuronas postsinápticas. En condiciones fisiológicas la actividad de la I_M , la cual está activa en las células en reposo y en valores del potencial cercanos al umbral del potencial de acción, reduce las descargas neuronales, en tanto que el efecto opuesto ocurre a medida que se inhibe la I_M .

Por lo tanto, el propósito del presente trabajo fue estudiar si el antidepresivo tricíclico IMI afecta la cascada de señalización intracelular que regula naturalmente a la corriente de K^+ tipo M, sin la participación de receptores membranales en las SCGs de rata, como se ha mostrado para las neuronas de corteza frontal de rata. Proponemos que la IMI ejerce sus acciones a nivel intracelular activando directamente a la PLC.

5. HIPÓTESIS

Si la imipramina afecta a la cascada de señalización intracelular que regula naturalmente a la corriente de K^+ tipo M (I_M), entonces su aplicación intracelular o su ingreso desde el lado extracelular activará alguna enzima, probablemente una fosfolipasa C, lo cual inhibirá a la I_M .

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Investigar el mecanismo de acción intracelular por el cual el antidepresivo tricíclico IMI afecta a la I_M .

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar electrofisiológicamente el efecto de la IMI sobre la I_M .

Caracterizar la dependencia del voltaje de la I_M en presencia de la IMI.

Determinar si la IMI incide sobre una proteína G para inhibir a la I_M .

Determinar si la IMI ejerce sus acciones directamente a nivel intracelular, sin participación de receptores de membrana.

Mostrar evidencia de que la forma hidrofóbica de la IMI es la responsable de sus acciones intracelulares.

Estudiar si el efecto de la IMI sobre la I_M es dependiente del Ca^{2+} .

Determinar si la IMI inhibe a la I_M como resultado de la activación de la PLC.

Determinar si la IMI reduce a la I_M como consecuencia de la depleción del PIP_2 .

7. MÉTODOS

7.1. CULTIVO DE LAS NEURONAS DE LOS GANGLIOS SIMPÁTICOS CERVICALES SUPERIORES

Está bien documentado que en las SCGs se puede aislar a la I_M (Marrion *et al.*, 1987) con el método de fijación de voltaje en configuración *whole-cell*. Existen varias razones para utilizar estas neuronas como modelo de estudio. En primer lugar, estas neuronas son fáciles de aislar ya que el ganglio simpático cervical superior es prominente y es una entidad anatómica bien definida. Segundo, esta preparación es una de las preparaciones más homogéneas en términos morfológicos (Banker y Goslin, 1991), bioquímicos (Higgins *et al.*, 1992) y electrofisiológicos (Schofield y Ikeda, 1988) en vertebrados. Tercero, las SCGs se adaptan y crecen rápidamente en una variedad de medios y sustratos, en ausencia o presencia de otros tipos celulares. Cuarto, las SCGs de ratas adultas en cultivo conservan sus propiedades fisiológicas naturales y son un modelo que posibilita el estudio de las corrientes membranales reguladas por voltaje. Se sabe (Schofield y Ikeda, 1988) que en esta preparación se encuentra prominentemente la I_M (Marrion *et al.*, 1987; Schofield y Ikeda, 1989).

7.2. PREPARACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE LAS NEURONAS DEL GANGLIO CERVICAL SUPERIOR DE RATA

Las SCGs se cultivan por métodos convencionales (Beech *et al.*, 1991; Bernheim *et al.*, 1991) modificados (García *et al.*, 1998). En esta metodología la dispersión celular es enzimática secuencial múltiple. Las SCGs se extraen de ratas (Wistar) macho de 5 semanas. Las ratas se sacrifican con CO_2 y se decapitan cortando cerca de las clavículas. La cabeza se

coloca con la cara hacia arriba en un una base de disección. El torax se asegura con dos alfileres. Un tercer alfiler se utiliza para hiperextender la cabeza; este estiramiento facilita la exposición del ganglio. Se realiza una incisión media en el cuello que se extiende desde la base de la garganta hasta la barbilla. En la línea media se separan, sucesivamente, la piel y la musculatura del cuello hasta exponer la traquea. Una vez localizada, ésta es retraída hacia la parte rostral. Esto deja a la vista a las glándulas submandibulares, las cuáles se remueven para exponer la capa de músculo. En este punto la bifurcación de la arteria carótida y el nervio vago son visibles. En la parte lateral de la bifurcación de la carótida se encuentra el ganglio nodoso. Las SCGs yace justo en la base de la bifurcación carótida en su aspecto medio y se puede encontrar replegando la arteria carótida. El complejo ganglio, nervio vago y arteria carótida se remueve como una sola unidad. Posteriormente se disecan los ganglios y se colocan en la solución salina Hanks modificada libre de Ca^{2+} y de magnesio. A continuación, se remueve mecánicamente la cápsula de tejido conectivo de cada ganglio con el fin de aumentar la relación entre el número de neuronas y el número de células no neuronales (fibroblastos) presentes en forma inicial en los cultivos. Después de la remoción de las cápsulas, los ganglios se cortan transversalmente en seis u ocho fragmentos pequeños de ~ 4 mm, para aumentar la la superficie del ganglio accesible a las enzimas proteolíticas, y asegurar una digestión más uniforme del mismo (Bashor, 1979).

Después de la disección, el ganglio se disocia mediante la exposición a varias enzimas, la mayoría de las veces esta disociación enzimática es seguida por la dispersión mecánica de la células (se pasa el ganglio a través de pipetas serológicas con punta angosta). La primera incubación se hace con 20 U/ml de papaína, ésta es seguida por dos incubaciones con 1 mg/ml de colagenasa y 10 mg/ml de dispasa. Cada incubación se realiza por 20 min a 37°C. La

disociación final del tejido se obtiene mecánicamente. La actividad enzimática se detiene por adición de medio de cultivo L-15 de Leibowitz adicionado con 10% de suero bovino fetal. Las células se centrifugan durante 7 min y se resuspenden dos veces con el mismo medio. En la última centrifugada las células se resuspenden en un volumen pequeño (~0.5 ml), y 70 μ l de esta suspensión se siembra en cajas de Petri de 35 mm para cultivo de tejidos, previamente cubiertas con Poli-L-lisina. La Poli-L-lisina se utiliza como sustrato para que las neuronas simpáticas se adhieren a las cajas de cultivo, al promover la interacción electrostática entre los iones negativamente cargados de la membrana celular y la superficie de las cajas de cultivo. El medio modificado Eagle de Dulbecco (D-MEM-Dulbecco's Modified Eagle Medium) se utiliza en el sembrado de las células. Este medio es rico en glucosa y está diseñado para equilibrarse a una atmósfera que contenga 10% de CO₂. El medio se complementa con 10% de suero fetal bovino para proveer los micronutrientes y factores de crecimiento necesarios para la supervivencia celular. Las neuronas se colocan en anillos de clonación de acrílico, tratados con Sigmacote (SIGMA) y previamente situados en el centro de cada caja de cultivo (35 mm de diámetro). Esto con el fin de mantener a las neuronas centradas y para evitar así su dispersión. Las cajas se transfieren a un incubador a 37°C (10% CO₂). Los anillos de clonación se quitan después de 40 min.

Inmediatamente después de la disociación, las SCGs tienen un soma que puede medir de 20 a 50 μ M y presentan algunas dendritas débilmente adheridas al sustrato. Después de una hora, las neuronas han reabsorbido sus dendritas y se han vuelto más esféricas. Al término de unas cuatro horas las neuronas se encuentran adheridas.

7.3. REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA CORRIENTE M

El método de fijación de voltaje en configuración *whole-cell* es un método poderoso para el estudio electrofisiológico de las corrientes iónicas macroscópicas que fluyen a través de la membrana celular. Con este método electrofisiológico se puede controlar el potencial de membrana, lo cual permite el estudio de la dependencia de voltaje de los canales iónicos y sus características cinéticas. Algunas de las ventajas de este método son las siguientes: Primero, los registros son resultado del promedio de las respuestas de todos los canales que se encuentran en la membrana de la célula. Segundo, se puede controlar la composición del interior de la célula a través del electrodo de registro.

Las corrientes se registran, a temperatura ambiente, utilizando la técnica de fijación de voltaje (Hamill *et al.*, 1981) con un amplificador EPC7 (marca). El protocolo para los voltajes se genera, y los datos se digitalizan, registran y analizan mediante el sistema BASIC-FASTLAB (Indec Systems, Capitola, CA) (García *et al.*, 1998).

Los datos estadísticos se expresaron como el promedio +/- el error estándar del promedio (SEM) y los promedios de la muestra se compararon con una prueba t de Student no pareada. * $p < 0.05$; prueba t versus control.

7.3.1. Aislamiento de la corriente de K^+ tipo M

La I_M es una corriente que se activa a potenciales que van desde -30 mV hasta -60 mV, en las SCGs. Se sabe, que a pulsos de voltaje despolarizantes se activan otras corrientes de K^+ (Marrion *et al.*, 1987; Lamas, 1999; Schofield y Ikeda, 1989) que dificultan el aislamiento de la I_M . Por lo tanto, para estudiar a la I_M sin la contaminación de otras corrientes empleamos la

estrategia que utilizan varios grupos de investigación (Adams *et al.*, 1982a y 1982b; Brown y Adams, 1980; Suh y Hille, 2002): estudiar la relajación (desactivación) de dicha corriente dando pulsos hiperpolarizantes (-60 mV) de 500 ms desde un potencial de mantenimiento despolarizante (-25 mV) cada 4 s.

Las soluciones están diseñadas para aislar a la I_M por métodos electrofisiológicos, y de sustitución iónica. Para aislar a la I_M utilizamos en la solución externa K^+ como catión externo principal y TTX como bloqueador de los canales de Na^+ . La solución externa (en mM): 160 NaCl, 2.5 KCl, 5 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, 8 Glucosa y 0.0002 TTX, pH = 7.4 con NaOH. La solución interna (en mM): 175 KCl, 5 $MgCl_2$, 5 HEPES, 0.1 BAPTA, 4 Na_2ATP , 0.3 Na_2GTP y 0.1 leupeptina, pH ajustado a 7.4 con KOH.

Dado que en el presente proyecto se estudia el efecto de la IMI sobre el canal M que se sabe es regulado por agonistas que se acoplan a proteínas G, la adición de GTP a la solución interna es indispensable. Sin GTP, los efectos de los neurotransmisores que dependen de éste desaparecen en 5 a 15 min en células pequeñas y muy dializadas (Bean, 1992). El Mg^{2+} intracelular es necesario para el comienzo y la terminación de la señalización por proteínas G (Suh *et al.*, 2004).

7.2.1.1. Decaimiento espontáneo de la corriente M

Como se mencionó anteriormente, los registros de fijación de voltaje en configuración de *whole-cell* permiten la diálisis de las moléculas tanto hacia adentro como hacia fuera de las células. Esto puede llevar al decaimiento de la corriente (rundown).

Varias sustancias se pueden agregar a la solución intracelular para prevenir el *rundown* de la corriente. El MgATP (2-3 mM) es esencial tanto para mantener activa a la corriente como para permitir la regulación de las corrientes por neurotransmisores. El GTP aunque parece ser menos esencial también contribuye a mantener activa a la corriente. Ambos nucleótidos se adicionan a la solución interna el día del experimento. También se utiliza un inhibidor de proteasas, la leupeptina que permite mantener a la corriente por varias horas. Así mismo la inclusión de substratos metabólicos como la glucosa en la solución externa disminuyen la tasa del proceso de *rundown* del canal M. Por otro lado, las corrientes dependientes de voltaje como la I_M y las mismas células son más duraderas si la $[Ca^{2+}]_i$ es amortiguada hacia niveles bajos. Para lograr dicho propósito se utilizó como amortiguador el ácido 1,2-bis(amino-etano *N,N,N,N'*-tetraácetico) (BAPTA).

Sistema de perfusión rápida. La perfusión local extracelular continua de las soluciones para aislar a la I_M y los recambios veloces de las mismas, se consiguieron mediante el arreglo de cuatro microcapilares de acero inoxidable pegados entre sí e insertados en la pipeta de registro. La elección de perfusión de cada uno de los capilares se controló con una serie de válvulas solenoides. La perfusión rápida y continua permitió estudiar el efecto de sustancias aplicadas intracelularmente, como es el caso del fármaco utilizado en este trabajo de tesis, evitando contaminación del medio extracelular.

7.4. REACTIVOS

Los reactivos se obtuvieron de la siguiente manera: imipramina y oxotremorina-M (RBI, Natick, MA, U.S.A.), GDP β S (SIGMA, St Louis, MO, U.S.A.), bradicinina (Pensinsula

Laboratories, Belmont, CA, U.S.A.), BAPTA (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.), U73122, U73343, wortmanina y PIP₂ (α -fosfatidil-D-mio-inositol-4,5-bisfosfato, sal de triamonio de cerebro de bovino) (Calbiochem, La Jolla, CA, U.S.A.). El U73122 y el U73343 se disolvieron en cloroformo hasta obtener una concentración final de 5 mM. Posteriormente se colocaron alícuotas en tubos Eppendorf, y el solvente se evaporó bajo N₂. Los tubos se guardaron a 4°C. El día del experimento una alícuota se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 2.5 mM. El PIP₂ se disolvió en cloroformo y las alícuotas se guardaron a -20°C bajo N₂. El día del experimento, el cloroformo se evaporó bajo N₂ hasta dejar una capa fina. La solución de registro (intracelular) se mezcló con este residuo durante ~10 min y después se sonicó en hielo hasta que la solución se aclarara (~30 min).

8. RESULTADOS

8.1. CARACTERIZACIÓN DE LA CORRIENTE M EN CULTIVOS PRIMARIOS DE LAS NEURONAS DEL GANGLIO SIMPÁTICO CERVIAL SUPERIOR DE RATA

En los estudios de la regulación de la I_M (Suh y Hille, 2002; Zhang *et al.*, 2003), la no inactivación de esta corriente se toma como ventaja para aislarla de otras corrientes, estudiando su desactivación. Para lograrlo, primero activan a la I_M despolarizando la célula a -25 mV, y luego la desactivan dando pulsos de voltaje hiperpolarizantes (-60 mV), como se describió con detalle en los antecedentes. Este protocolo de pulsos hiperpolarizantes está bien establecido (Adams *et al.*, 1982a y 1982b; Brown y Adams, 1980). Así mismo, el agonista muscarínico Oxo-M es uno de los compuestos más empleados en la investigación del mecanismo de regulación de la I_M , y es, por lo tanto, una de las vías mejor esclarecidas.

Los primeros experimentos realizados para el presente trabajo de tesis tuvieron como fin reproducir el registro clásico de la I_M en presencia y en ausencia del agonista Oxo-M. La Oxo-M se utilizó en diversos experimentos para comparar su efecto con el de la IMI. En la Fig.1A se muestran trazos típicos de la I_M en ausencia y en presencia del agonista muscarínico Oxo-M, obtenidos mediante la técnica de fijación de voltaje en configuración *whole-cell*, de la SCG de rata. Esta célula se mantuvo a un potencial de membrana relativamente despolarizado (-25 mV). A este voltaje la I_M se encuentra activa y estable. Cuando se aplicó un pulso hiperpolarizante (-60 mV) se observó la desactivación de la corriente. Posteriormente, la repolarización produjo una relajación saliente. La

amplitud de la I_M se midió en los registros de la desactivación de la corriente como la diferencia entre su amplitud promedio durante los 10 ms, comprendidos entre los 20-30 ms de que se estableció la corriente (Y1) y el valor promedio durante los últimos 50 ms (Y2). Como se ha reportado (Brown y Adams, 1980; Bernheim *et al.*, 1992; Marrion *et al.* 1989), la Oxo-M ($10 \mu\text{M}$) redujo la amplitud de la I_M . La inhibición de la corriente se observó en la reducción de la desactivación de la corriente (Y1-Y2) y en el corrimiento de la corriente de mantenimiento. En presencia de la Oxo-M la corriente permaneció sin cambios en su cinética de desactivación o cambios en su dependencia del tiempo (~ 100 ms). También puede observarse que una mínima parte del trazo de la desactivación de la I_M en presencia de la Oxo-M se vuelve parcialmente entrante. Se ha propuesto (Brown y Selyanko, 1985; Colino & Halliwell, 1993; Lamas, 1998) que este efecto puede deberse principalmente a la acción de una corriente de fuga de cloro (Brown y Selyanko, 1985) y/o a la corriente catiónica I_h (Lamas, 1998). La I_h a -60 mV, potencial al cual se activa, aparece también como una corriente de fuga (Colino & Halliwell, 1993). En el tercer trazo se muestra la resta digital del trazo en presencia de la Oxo-M (2) al trazo control (1). Así mismo, en la Fig. 1B se observa el efecto inhibitorio característico de la Oxo-M sobre el curso temporal de la I_M , del cual se recupera parcialmente durante el lavado.

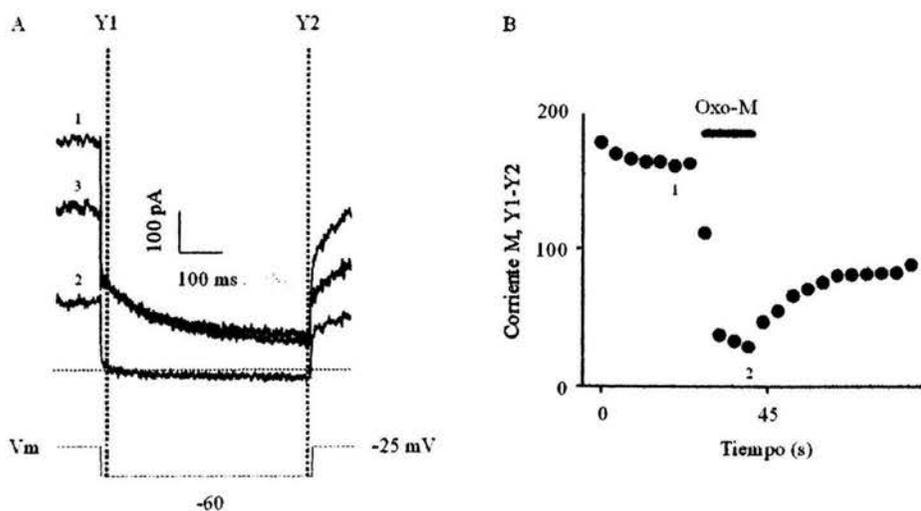


Fig. 1 Inhibición típica de la corriente M por oxotremorina-M. (A) Trazos sobrepuestos de la I_M , obtenidos con el protocolo de pulsos de voltaje que se muestra en la parte inferior, antes (1) y durante la aplicación de Oxo-M (10 μ M) (2). (3) Trazo de la I_M que resulta de restar digitalmente el trazo en presencia de la Oxo-M (2) al trazo control (1). (B) Efecto inhibitorio de la Oxo-M sobre la amplitud de la I_M . La amplitud de la I_M se midió como la diferencia entre el promedio de 10 ms tomados a los 20-30 ms de que se estableció la corriente (Y1) y el promedio de los últimos 50 ms (Y2).

Posteriormente, para mostrar farmacológicamente que la corriente registrada fluía a través de los canales de K^+ tipo M se utilizaron bloqueadores genéricos de las corrientes de K^+ (TEA, Ba^{2+}) y un bloqueador específico de la I_M (linopiridina). En la Fig. 2 se muestra que el $47.6 \pm 3 \%$ y el $39 \pm 5 \%$ de la I_M se inhibió por los bloqueadores de los canales de K^+ , TEA (10 mM) y Ba^{2+} (200 μ M) respectivamente. El bloqueador selectivo de los canales M, la linopiridina (10 μ M), inhibió el 71.2 % de la I_M . Como se ha mostrado para neuronas de hipocampo CA1 (Schnee y Brown, 1998), el bloqueo de la I_M por linopiridina fue muy poco reversible (observar el trazo 3 de la Fig. 2F).

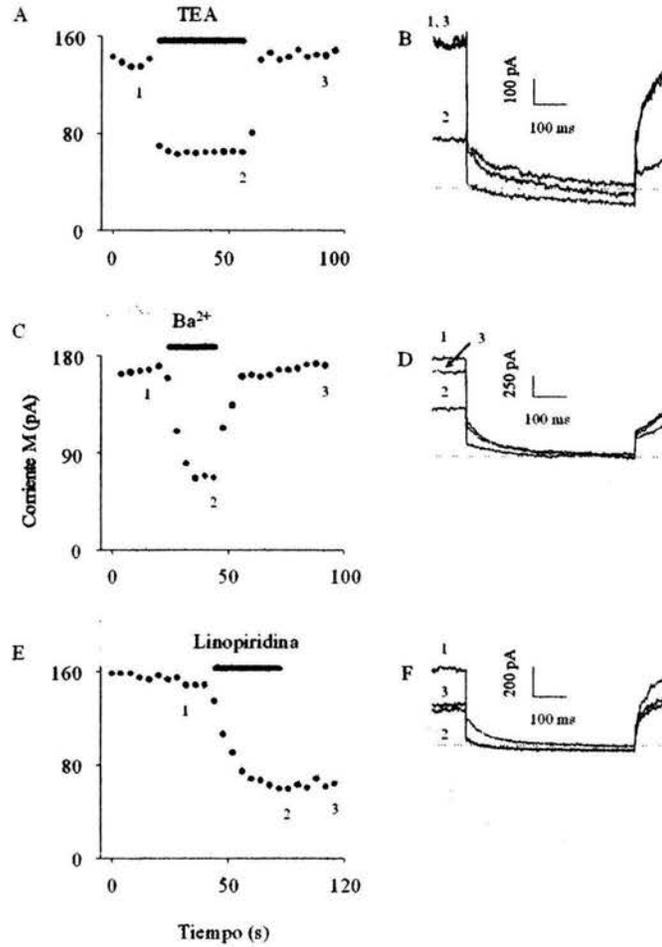


Fig. 2 Caracterización farmacológica de la corriente M. (A) Inhibición de la I_M por TEA (10 mM). (B) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (A) antes (1), en presencia de TEA (2) y durante el lavado (3). (C) Inhibición de la I_M por Ba^{2+} (200 μM). (D) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (C) antes (1), en presencia de Ba^{2+} (2) y durante el lavado (3). (E) Inhibición de la I_M por linopiridina (10 μM). (F) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (E) antes (1), en presencia de Ba^{2+} (2) y durante el lavado (3).

También se observó el curso temporal rápido característico de la inhibición de la I_M por estos bloqueadores. La τ de inhibición (en segundos) fue de 1.3 ($n = 3$) para el TEA, 10.4 ± 3 ($n = 4$) para el Ba^{2+} , y de 11.3 ± 3 ($n = 4$) para la linopiridina. Estos experimentos permitieron identificar a la corriente registrada como una corriente de K^+ tipo M.

8.2. LA IMIPRAMINA INHIBE A LA CORRIENTE M EN FORMA REVERSIBLE Y DEPENDIENTE DE LA CONCENTRACIÓN

Las acciones de la IMI sobre receptores de membrana (Cusack *et al.*, 1994; Golds *et al.*, 1980) y el bloqueo de la recaptura de neurotransmisores en las terminales aminérgicas (Frazer, 1997) han sido las más estudiadas, sin embargo, sus acciones a nivel celular y subcelular, y sus repercusiones a nivel de la excitabilidad general están aún pobremente entendidos. Por lo tanto, en los siguientes experimentos se quiso explorar el efecto de la IMI sobre la I_M , la cual juega un papel dominante en la regulación de la excitabilidad celular. Con este propósito, se registró el curso temporal de la I_M en presencia de la IMI y se probaron diferentes concentraciones del ATC.

La Fig. 3A muestra que 50 μM de IMI redujo la amplitud de la I_M en más del 50% ($80 \pm 3\%$) y que se recuperó en $\sim 80\%$ durante el lavado posterior, lo cual sugirió la posibilidad interesante de que este fármaco aumentara la excitabilidad en el sistema nervioso a través de una reducción en la I_M . Si se toma en cuenta que a un potencial de mantenimiento de -25 mV la I_M estaba completamente activa, la inhibición de la I_M , también se manifestó por el desplazamiento de la corriente de mantenimiento con respecto a la del control. La inhibición producida por la IMI, además de ser reversible, fué, también, dependiente de la concentración con un IC_{50} de 7 μM y un coeficiente de Hill de 0.8 (Fig. 3E).

Es interesante notar que el IC_{50} obtenido coincide con el reportado para la inhibición de la corriente de K^+ transiente (I_A) neuronal por IMI (7 μM) (Kuo, 1998) y con el de un rectificador de K^+ tardío (6.8 μM) (Wooltorton y Mathie, 1993). El coeficiente de Hill cercano a la unidad podría indicar que la IMI estuviera inhibiendo al canal M a través de un mecanismo de bloqueo

directo del canal como se propone (García-Ferreiro *et al.*, 2004; Kuo, 1998; Wooltorton y Mathie, 1993) para otros canales de K^+ . Sin embargo, llama la atención el efecto retardado ($\tau = \sim 16$ s, $n = 8$) de la IMI sobre la I_M , el cual coincidió con la τ de inhibición obtenida para agonistas que emplean una cascada que involucra un segundo mensajero (10-100 veces más lenta que la delimitada a la membrana que se lleva a cabo en < 1 s). Esto abre la posibilidad de que la IMI esté inhibiendo a la I_M a través de un mecanismo indirecto.

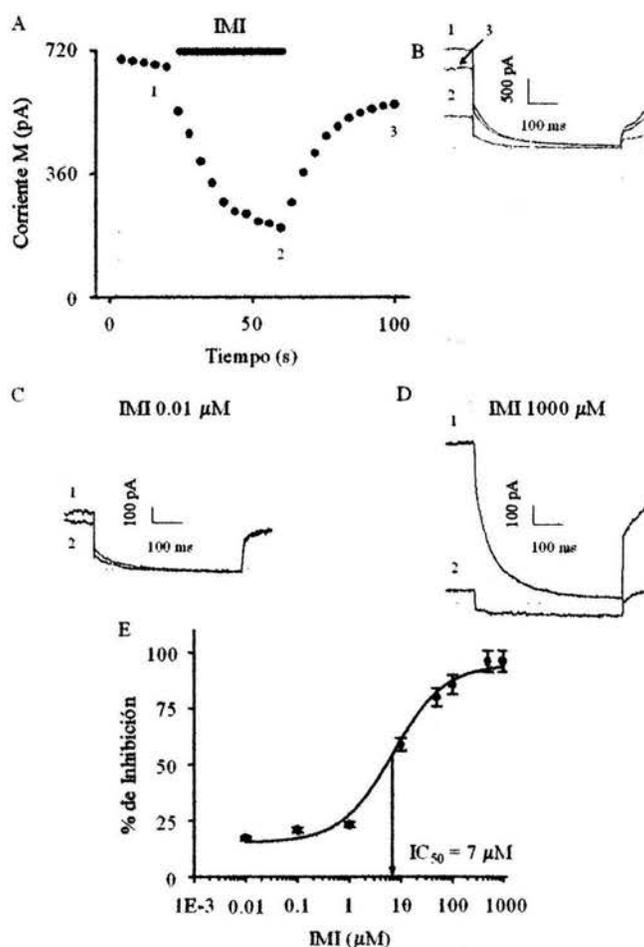


Fig. 3 Efecto de la imipramina sobre la corriente M. (A) Inhibición de la I_M por IMI (10 μ M). (B) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (Δ) antes (1), durante la aplicación de IMI (2) y durante el lavado (3). Trazos sobrepuestos de la I_M en ausencia (1) y en presencia de IMI (0.01 μ M) (2). (D) Trazos sobrepuestos de la I_M en ausencia (1) y en presencia de IMI (1000 μ M) (2). (E) Curva concentración-respuesta. Las concentraciones de IMI se graficaron en una escala semilogarítmica. Los datos se ajustaron a una función logística, $y = [(A_1 - A_2) / (1 + (X/X_0)^p)] + A_2$, en donde A_1 es el valor inicial que corresponde al porcentaje mínimo de inhibición, A_2 el valor final que corresponde al porcentaje máximo de inhibición, X_0 el IC_{50} y p el coeficiente de Hill.

8.3. LA INHIBICIÓN DE LA CORRIENTE M ES INSENSIBLE AL VOLTAJE

Dado que hay antecedentes de que la IMI bloquea canales de K^+ como el E_{ag} , el I_A por un mecanismo de canal abierto (García-Ferreiro *et al.*, 2004; Kuo, 1998) y a canales HERG mediante un mecanismo sensible al voltaje (Teschmacher *et al.*, 1999); se procedió a estudiar si el efecto de la IMI era sensible al voltaje (Fig. 4). Para ello, se midió la activación de la I_M en el estado estacionario, antes y una vez que la IMI alcanzara su efecto máximo. Como se esperaba, el umbral de activación de la I_M estuvo cercano a -60 mV y la mayor parte de los canales estuvieron activos a -30 mV. A diferencia de lo descrito en otros canales (Teschmacher *et al.*, 1999) la IMI únicamente redujo la conductancia macroscópica mediada por los canales M en todos los pulsos de voltaje explorados, pero no cambió la curva de activación (Fig. 4B). Consistente con un mecanismo de inhibición insensible al voltaje, los valores de la curva de activación en presencia de la IMI se superpusieron a los valores de la curva de activación control, cuando los valores de la inhibición de la I_M por IMI se escalaron a los de los valores control (Fig. 4C). La inhibición de la I_M mediante un mecanismo insensible al voltaje se confirmó con el ajuste de las curvas de activación a una función simple de Boltzmann, el cual arrojó valores sin ninguna diferencia significativa en el $V_{1/2}$ y en el factor de la pendiente (ver Tabla 1).

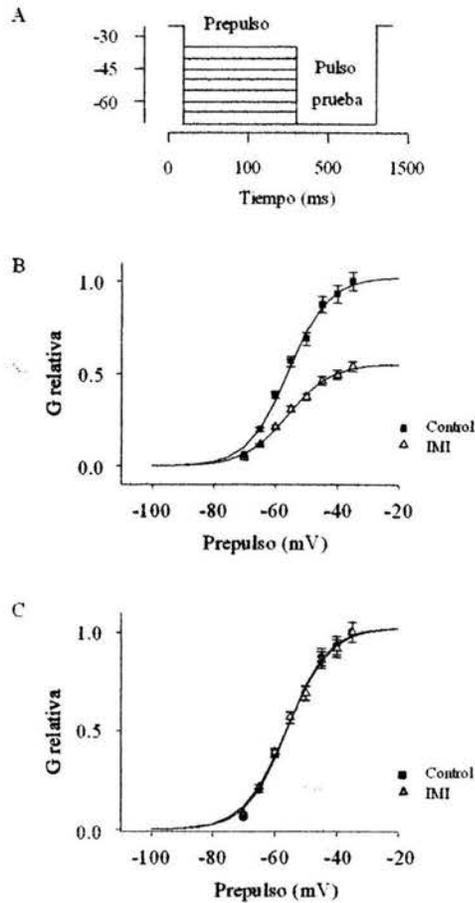


Fig. 4 Curva de conductancia-voltaje de la corriente M. (A) Protocolo de pulsos: pulso de mantenimiento a -70 mV precedido por prepulsos despolarizantes en escalones de 5 mV (desde -70 mV hasta -35 mV), desde un potencial de mantenimiento de -25 mV. (B) Curva conductancia-voltaje para los canales M, construida mediante el protocolo mostrado en (A), antes (círculos) y durante la exposición IMI (triángulos). La $V_{1/2}$ y los valores del ajuste de la función de Boltzmann se muestran en la tabla 1 ($n = 4$). (C) Los datos de la curva conductancia-voltaje de la I_M relativa con IMI (triángulos) mostrados en (B) se escalaron a los datos control (círculos abiertos). El ajuste de Boltzmann de los datos control y en presencia de IMI están sobrepuestos.

	I (pA/pF)	$V_{1/2}$ (mV)	K (g/mV)
Control	0.76±.03	-55.89±.8	6.43±0.6
IMI	0.41±.01	-56.01±.8	6.85±0.6

Tabla 1. Parámetros derivados del ajuste de una función de Boltzmann simple.

Por otro lado, se ha propuesto (Armstrong y Bezanilla, 1977; Bezanilla y Armstrong, 1977) que un mecanismo de bloqueo de canal abierto modifica la cinética de la corriente. Por ejemplo, la alteración de la cinética de la corriente de los canales HERG por IMI llevaron a Teschemacher *et al.* (1999) a sugerir un bloqueo parcial del canal en estado abierto. Con la intención de examinar si la IMI inhibió al canal M mediante un mecanismo de bloqueo de canal abierto, se ajustó una exponencial simple a las corrientes de cola. El ajuste arrojó una τ de 87 ± 7 ms ($n=9$) y 87.8 ± 9 ms ($n=8$) para el control y para la IMI respectivamente. Estos datos indicaron que la IMI no modificó la cinética de desactivación y tampoco indujo cambios en la dependencia del tiempo de la I_M .

La τ de inhibición de la I_M por IMI, su insensibilidad al voltaje y la ausencia del cambio en la cinética de desactivación en presencia de la IMI sugirieron un mecanismo de inhibición de la I_M por IMI distinto al de un bloqueo de canal abierto.

8.4. LA IMIPRAMINA APLICADA EN LA PIPETA DE REGISTRO

REDUCE LA CORRIENTE M

En los experimentos previos la IMI se aplicó en el medio extracelular. Sin embargo, la forma no cargada de la IMI pudo haber cruzado la membrana fácilmente. Debido a que tanto la solución externa como la interna se encontraban a pH 7.4, y no hubo un “lavado” continuo y rápido del espacio intracelular, la concentración de la IMI intracelular pudo haber aumentado y alcanzado los mismos niveles de concentración que la IMI en la solución externa. Por ello, debe descartarse el efecto intracelular de la IMI.

Tomando ventaja del cambio rápido y continuo de la solución del espacio extracelular en el dispositivo experimental, se examinó el efecto de la IMI mediante la adición de 50 μM de IMI a la solución de la pipeta. Bajo estas condiciones, la IMI que cruzó la membrana alcanzando el exterior se lavó rápidamente, y por lo tanto la IMI que se aplicó en el interior no aumentó su concentración en la solución externa. De manera similar a lo encontrado en los experimentos en los que se aplicó la IMI extracelularmente, la IMI aplicada a través de la pipeta de registro inhibió a la I_M después de algunos segundos de haberse roto el sello (Fig. 5B). La IMI en estas condiciones inhibió a la I_M en un $47 \pm 8 \%$ ($n = 16$). La recuperación de la I_M de su inhibición por IMI no se observó debido a que la IMI se aplicó en la pipeta de registro y por lo tanto no se pudo lavar su efecto sobre la I_M . El efecto de la IMI también pudo apreciarse en los trazos representativos de este experimento en el panel 5B.

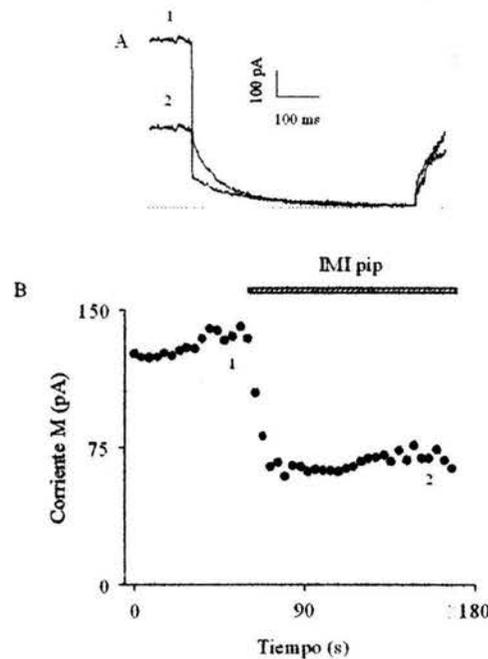


Fig. 5 Efecto de la aplicación de la imipramina en la pipeta de registro sobre la corriente M. (A) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (B) en ausencia (1) y en presencia de IMI (2). (B) Efecto inhibitorio de la IMI (50 μM) sobre la amplitud de la I_M .

Estos datos sugirieron la posibilidad de que la IMI estuviera cruzando la membrana y desde el interior estuviera inhibiendo a la I_M , como se propone para la inhibición de los canales hEag1 (García-Ferreiro *et al.*, 2004).

8.5. LA INHIBICIÓN DE LA CORRIENTE M POR IMIPRAMINA

AUMENTA A PH 8

Se han realizado diversos experimentos con el objeto de investigar cuál es la forma de la IMI responsable de la inhibición de algunos canales de K^+ . Como se expuso en los antecedentes, en algunos casos se ha propuesto que los ATC como la IMI y la amitriptilina en su forma neutra son las responsables de la inhibición de la I_A (Kuo, 1998) y de un rectificador de K^+ tardío (Wooltorton y Mathie, 1995) respectivamente. En cambio se sugiere (García-Ferreiro *et al.*, 2004) que es la forma cargada de la IMI la que inhibe al canal hEag1.

Dado que la IMI es una base débil que se puede protonar y volver una molécula cargada en solución acuosa, se realizaron experimentos cambiando el pH de la solución externa en presencia de la IMI para indagar acerca de la forma química de la IMI que inhibe con mayor eficiencia al canal M. Se utilizó una concentración nominal de 5 μ M de IMI para ver el efecto más claro de la IMIn. Como el pKa de la IMI es de 9.5, a pH 7.4 se encuentra mayormente cargada. En las Fig. 6A y 6B se aprecia que el efecto de la IMI se vió favorecido cuando se aumentó el pH externo de 7.4 a 8. Lo cual sugirió que la IMIn es más activa que la forma cargada.

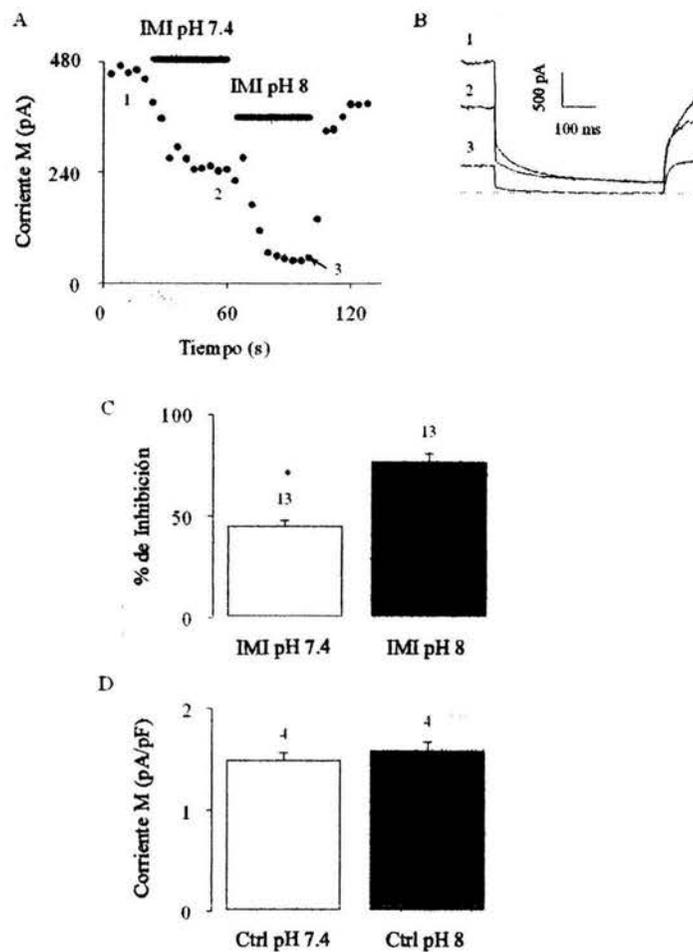


Fig. 6 Efecto del pH en la inhibición de la corriente M por imipramina. (A) Efecto inhibitorio de la I_M por IMI a pH 7.4, y a pH 8. (B) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (A) en ausencia (1), y en presencia de IMI a pH 7.4 (2) y a pH 8 (3). (C) Resumen de datos de la inhibición de la I_M por IMI a pH 7.4 y a pH 8. (D) Resumen de datos de la densidad de la I_M a pH 7.4 y a pH 8.

La IMI a pH 7.4 produjo una inhibición de 45.8 %. Este porcentaje de inhibición aumentó a 88.3 % a pH 8 (Fig. 6C). Con el fin de descartar cualquier efecto directo del pH sobre la I_M se comparó la densidad de la corriente a pH 7.4 y a pH 8 en ausencia de la IMI. El cambio de pH desde un valor fisiológico a un nivel alcalino no tuvo un efecto significativo sobre la densidad de la I_M (Fig. 6D). La densidad media de la I_M a pH 7.4 y 8 fue de 1.5 ± 0.1

pA/pF y 1.6 ± 0.1 pA/pF, respectivamente. Consecuentemente la mayor inhibición de la I_M a pH 8 pudo deberse a una mayor concentración intracelular de IMIn (ver discusión).

8.6. LA IMIPRAMINA INHIBE A LA CORRIENTE M SIN LA ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA G

Dado que una de las principales vías de regulación de la I_M es a través de la activación del receptor muscarínico M_1 , en experimentos preliminares del laboratorio se descartó la activación de este receptor por IMI en la inhibición de la I_M . La aplicación del antagonista del receptor muscarínico M_1 , pirenzepina no modificó la inhibición de la I_M por IMI. Así mismo, la inhibición de la I_M por IMI se mantuvo en presencia del antagonista muscarínico M_4 . Este resultado junto con resultados anteriores sugirieron que la IMI inhibe a la I_M en un paso posterior a la activación de algún receptor membranal. En las neuronas del ganglio de la raíz dorsal, la interrupción de la inhibición de los canales de Ca^{2+} tipo L por IMI en presencia de PTX indicó la participación de una proteína G (Choi *et al.*, 1992). Por lo tanto, la IMI pudo haber inhibido al canal M mediante la activación de una proteína G. En la Fig. 7 se muestran experimentos que descartaron esta posibilidad, mediante la diálisis de las neuronas con el bloqueador de la señalización por proteínas G, GDP β S. La vía muscarínica, la cual inhibe a la I_M mediante la activación de una proteína G, se utilizó como indicador de que el GDP β S estaba activo.

Bajo condiciones control, cuando las neuronas se dializaron con la solución interna que contenía GTP (0.3 mM), se observó la inhibición característica de la I_M por Oxo-M (10 μ M) y por IMI (10 μ M). La corriente se inhibió en más del 70% por Oxo-M y se recuperó

parcialmente después del lavado de la Oxo-M . Posteriormente se observó un 50% de inhibición por IMI (Figs. 7A y B). Por el contrario, y como se esperaba, cuando se dializaron las neuronas durante 10 min con GDPβS, la inhibición de la corriente por Oxo-M, se suprimió significativamente (Fig. 7C y D). Bajo estas mismas condiciones, en cambio, se observó que el efecto de la IMI sobre la I_M fue similar al mostrado en la Fig. 7A. Permaneció la inhibición de la corriente y no hubo un cambio en la cinética de la inhibición (Figs. 7C y D). Esta diferencia en la dependencia de la proteína G entre la Oxo-M y la IMI se confirmó en otros experimentos cuyos resultados se resumen en la Fig. 7E. El porcentaje de inhibición de la I_M por Oxo-M en condición control fue de 81.7 ± 4 (n = 6) y en presencia de GDPβS de 12.4 ± 4 (n = 5). Para la IMI, en condiciones control, el porcentaje de inhibición fue de 53.7 ± 4 (n = 6) y en presencia de GDPβS fue de 50.3 ± 3 (n = 6).

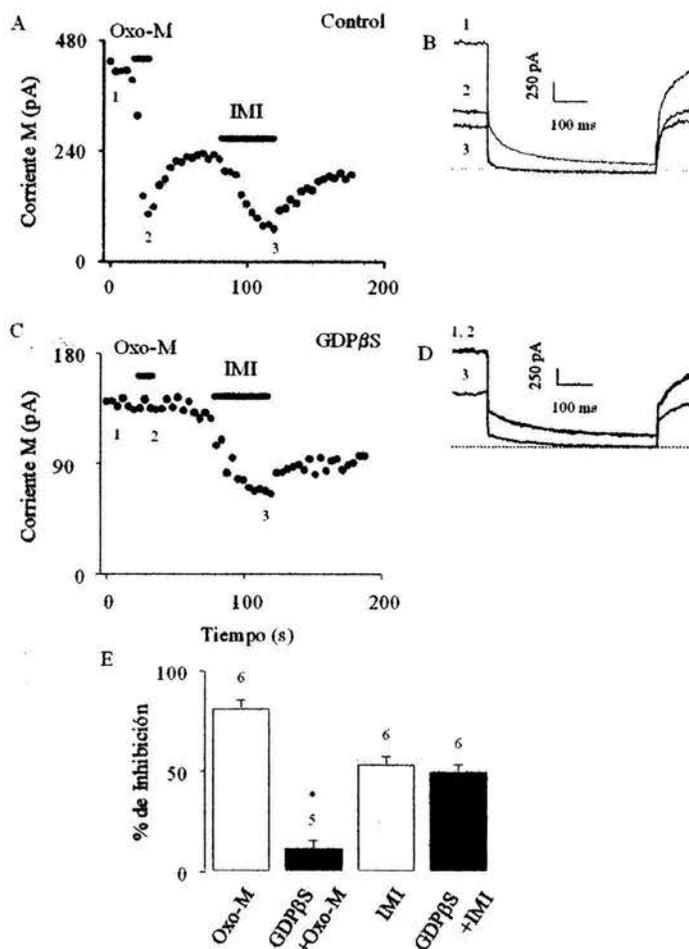


Fig. 7 Efecto de la imipramina sobre la corriente M en presencia del bloqueador de proteínas G, GDP β S. (A) Inhibición de la I_M por 10 μ M de Oxo-M y 10 μ M de IMI en ausencia de GDP β S en la pipeta de patch. (B) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (A) antes (1) y durante la aplicación de Oxo-M (2) e IMI (3). (C) Inhibición de la I_M por 10 μ M Oxo-M y 10 μ M IMI en presencia de GDP β S (3 mM) en la pipeta de patch. (D) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de C antes (1) y durante la aplicación de Oxo-M (2) e IMI (3). (E) Resumen de los experimentos.

La IMI, por lo tanto, podría estar inhibiendo al canal M en un paso posterior a la activación de la proteína G. Algunos datos indican que la IMI activa directamente a la PLC (Fukuda *et al.*, 1994; Cadiou y Molle, 2003) y promueve la formación de IP₃ en neuronas de corteza frontal de rata (Shimizu *et al.*, 1993). Si se considera que la IMI inhibió a la I_M con una τ de inhibición prolongada (16 s), sin cambios en su dependencia del voltaje o cinética (ver Fig. 4), llama la atención que estos efectos fueron similares a los obtenidos en la inhibición de la I_M

por los agonistas muscarínicos (Suh y Hille, 2002) y el neuropéptido BC (Jones *et al.*, 1995; Haley *et al.*, 2000). La pregunta que surgió entonces fue si la IMI activa substratos intracelulares para inhibir a la I_M .

8.7. LA IMIPRAMINA REQUIERE DE LA ACTIVACIÓN DE LA FOSFOLIPASA C PARA INHIBIR LA CORRIENTE I_M

A fin de explorar la posibilidad de que la IMI estuviera afectando una vía de señalización específica que involucra la activación de la PLC, se procedió a utilizar un inhibidor genérico de la PLC, el U73122 y su análogo inactivo, el U73343. Se utilizó a la BC como indicador de que el inhibidor y el análogo inactivo estuvieran activos. En estos experimentos las SCGs se incubaron con el U73343 (10 μ M; Figs. 8A y C) o con el U73122 (Fig. 8E) durante 5 min.

En concordancia con los resultados ya reportados (Cruzblanca *et al.*, 1998; Suh y Hille, 2002) se observó, en presencia del análogo inactivo, la inhibición (38.1 ± 7 %; $n = 5$) característica de la I_M por BC (100 nM) (Fig. 8A). Así mismo se observó que la inhibición de la I_M por BC no se revirtió con facilidad en presencia del U73343. Este resultado pudo deberse a dos factores. Primero, a que en condiciones control la recuperación de la I_M se lleva a cabo en varios cientos de segundos (>300) (Cruzblanca *et al.*, 1998), y segundo a que el U73343 al reducir la amplitud de la I_M (Suh y Hille, 2002) dificulte la recuperación de la I_M de su inhibición por IMI.

Esta inhibición se suprimió en las células tratadas con el inhibidor de la PLC (2.7 ± 2 %, $n = 10$; Fig. 8E). En el caso de la IMI (10 μ M), la inhibición en presencia del análogo inactivo

($54.1 \pm 6 \%$, $n = 10$; Fig. 8C) fue semejante al porcentaje obtenido en las células control ($58.1 \pm 2 \%$, $n = 9$). No obstante, puede apreciarse en la Fig. 8E que la inhibición de la I_M por IMI en presencia del inhibidor de la PLC se redujo ($14.2 \pm 4 \%$, $n = 8$) significativamente ($P < 0.05$).

Estos resultados, sugirieron la posibilidad de que la IMI estuviera inhibiendo a la I_M mediante la activación de la PLC. Surgió, entonces, la pregunta ¿Es posible que la IMI inhiba al canal M mediante un mecanismo similar al de la BC o al de la Oxo-M?

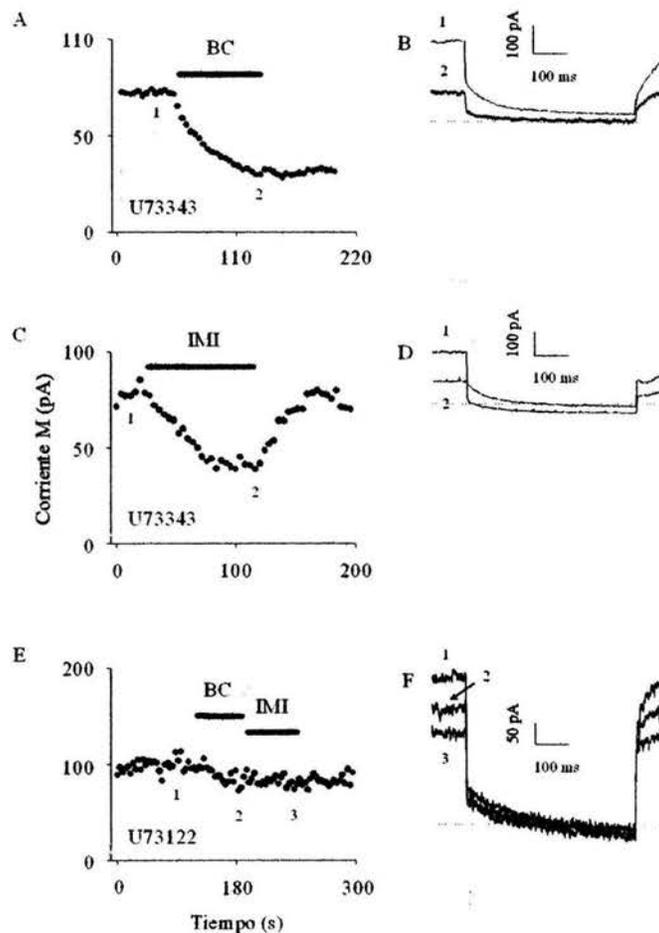


Fig. 8 Efecto de la bradicinina y la imipramina sobre la corriente M en presencia del inhibidor de la PLC, U73122. Las SCGs se incubaron con el aminoesteroido U73122 (10 μ M) o con su análogo inactivo U73343 (10 μ M). (A) Efecto del U73343 sobre la amplitud de la I_M en presencia de BC (100 nM). (B) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (A). (C) Efecto del U73343 sobre la amplitud de la I_M en presencia de IMI (10 μ M) (A). (D) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (C). (E) Efecto del U73122 sobre la amplitud de la I_M en presencia de BC (100 nM) e IMI (10 μ M). (F) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (E).

A pesar de que la Oxo-M, al igual que la BC, inhibe a la I_M mediante la activación de la PLC, se han sugerido mecanismos distintos de inhibición. La activación de los receptores M_1 estimula a la $PLC\beta_1$ (Berstein *et al.*, 1992; Dippel *et al.*, 1996), mientras que la de los receptores B_2 estimula a la $PLC\beta_4$ (Haley *et al.*, 2000).

Además, los agonistas muscarínicos no alteran la concentración de Ca^{2+} intracelular en las neuronas simpáticas (Beech *et al.*, 1991), mientras que la BC inhibe a la I_M a través de un mecanismo lento, bien conocido, mediado por el sistema de Ca^{2+} -calmodulina, que depende de la liberación de Ca^{2+} de los reservorios sensibles a IP_3 (Cruzblanca *et al.*, 1998).

Con el fin de probar si la IMI inhibe a la I_M mediante una señal de Ca^{2+} , o a través de una proteína sensible a Ca^{2+} (Shimizu *et al.*, 1993; Selyanko *et al.*, 1996), se dializaron las neuronas durante 9 min con el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA. Los niveles basales de las SCGs están alrededor de 100 nM. En cambio con 20 mM de BAPTA en la pipeta la concentración de Ca^{2+} libre es < 20 nM (Beech *et al.*, 1991). La BC (50 nM), en presencia de 0.1 mM de BAPTA en la pipeta, inhibió a la I_M en un 43.1 ± 2 %. Como se esperaba, la inhibición (7.8 ± 3 %, $n = 11$; Fig. 9E) se suprimió en presencia de 20 mM de BAPTA. En las Figs. 9B y E se observó claramente que la IMI (50 μ M) inhibió a la I_M en ausencia (78.1 ± 2 %, $n = 8$) y en presencia de 20 mM de BAPTA (75.8 ± 5 %, $n = 7$) sin cambios significativos ($P < 0.05$) en el porcentaje de inhibición. En el caso de la Oxo-M, se ha reportado que la presencia de 20 mM de BAPTA en la pipeta, no suprime la inhibición de la I_M en las SCGs (Cruzblanca *et al.*, 1998).

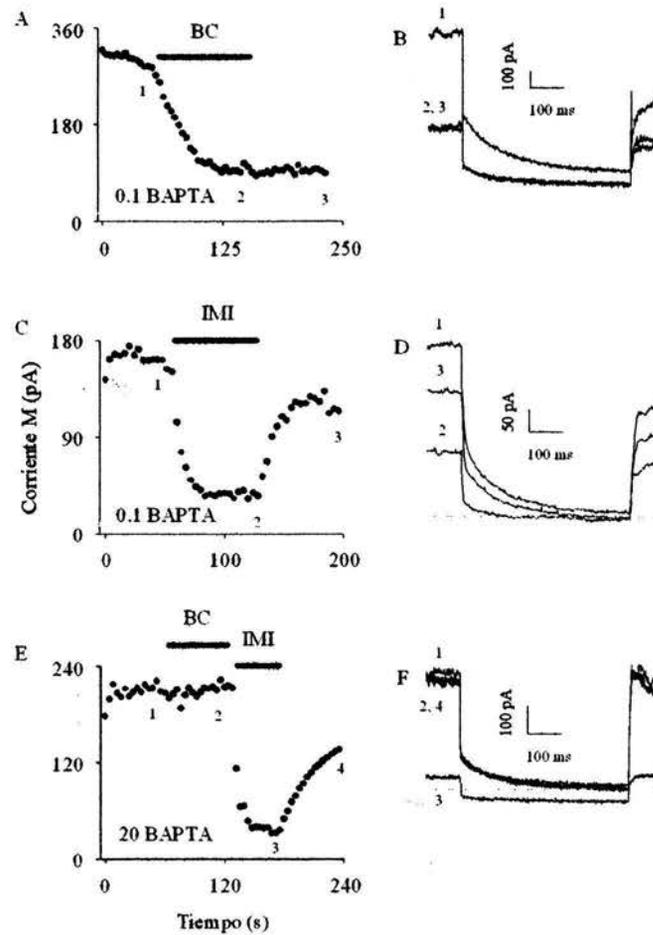


Fig. 9 Efecto de la imipramina sobre la corriente M en presencia del quelante de Ca^{2+} BAPTA. (A) Inhibición de la I_M por BC (100 nM) en células dializadas con 0.1 mM de BAPTA. (B) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (A) antes (1), en presencia de BC (2) y durante el lavado (3). (C) Inhibición de la I_M por IMI (10 μM) en células dializadas con 0.1 mM BAPTA. (D) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (C) antes (1), en presencia de IMI (2) y durante el lavado (3). (E) Inhibición de la I_M por BC (100 nM) e IMI (10 μM) en células dializadas con 20 mM de BAPTA. (F) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (E) antes (1), en presencia de BC (2) o IMI (3) y durante el lavado (4).

Estos resultados argumentan en contra de una inhibición de la I_M por IMI dependiente de Ca^{2+} y favorecen la posibilidad de que la IMI esté incidiendo sobre la cascada de señalización que inhibe a la I_M en forma semejante a como lo hace la Oxo-M.

Por lo tanto, en los siguientes experimentos, se comparó el efecto de la Oxo-M y la IMI en presencia de los aminoesteroides U73343 y U73122. La Fig. 10 muestra los resultados obtenidos en las SCGs incubadas con U73343 (10 μM ; Fig. 10A) o U73122 (10 μM ; Fig. 10B) durante 5 min. De manera similar a lo obtenido por Suh y Hille (2002), se muestra que la

inhibición de la I_M por Oxo-M 10 μM en las células tratadas con el análogo inactivo fue de $82.9 \pm 4 \%$ ($n = 5$) (Fig. 10A). Esta inhibición se redujo significativamente ($P < 0.05$) en las células tratadas con el inhibidor de la PLC ($6.7 \pm 3 \%$, $n = 5$; Fig. 10E). Así mismo, se observó la inhibición esperada de la I_M por IMI (10 μM) en las células control ($50.8 \pm 7 \%$, $n = 4$) y en las células tratadas con el análogo inactivo ($47 \pm 4 \%$, $n = 5$; Fig. 10C). Esta inhibición también se redujo ($7.3 \pm 3 \%$, $n = 5$, Fig. 10E) significativamente ($P < 0.05$) en las células tratadas con el inhibidor de PLC.

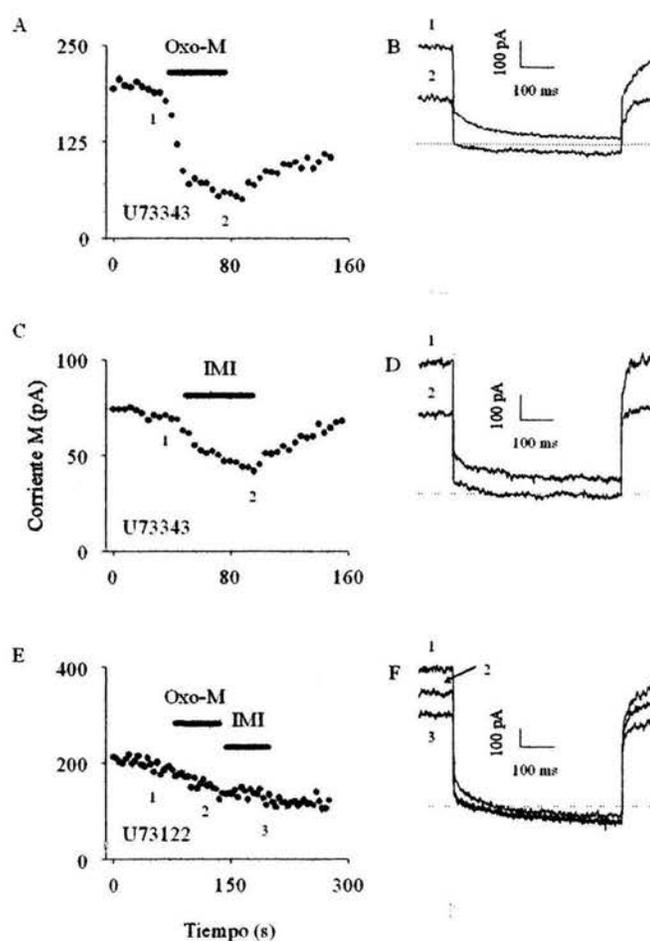


Fig. 10 Efecto de la oxotremorina-M y la imipramina sobre la corriente M en presencia del inhibidor de PLC, U73122. Las SCGs se incubaron con el aminoesteroido U73122 (10 μM) o con su análogo inactivo U73343 (10 μM). (A) Efecto del U73343 sobre la amplitud de la I_M en presencia Oxo-M (10 μM). (B) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (A). (C) Efecto del U73343 sobre la amplitud de la I_M en presencia de IMI (10 μM) (A). (D) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (C). (E) Efecto del U73122 sobre la amplitud de la I_M en presencia de Oxo-M (10 μM) e IMI (10 μM). (F) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (E).

A la luz de estos resultados, se profundizó sobre la posibilidad de que la IMI estuviera incidiendo en la cascada de señalización que inhibe naturalmente a la I_M .

8.8. LA APLICACIÓN INTRACELULAR DEL FOSFATIDILINOSITOL 4,5-BISFOSFATO PREVIENE LA INHIBICIÓN DE LA CORRIENTE M POR IMIPRAMINA

Se ha propuesto que una reducción en la concentración de PIP_2 , como ocurriría después de la activación de la PLC (Willars *et al.*, 1998), podría ser la responsable para el cierre del canal M inducido por el agonista (Suh y Hille, 2002; Winks *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003). Una de las estrategias que Suh y Hille (2002) utilizaron para probar esta hipótesis fue el uso de bloqueadores del reciclaje de los reservorios de PIP_2 . Bajo estas condiciones previnieron la recuperación de la I_M de la inhibición muscarínica. Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis, se quiso investigar si la inhibición de la I_M por IMI es también irreversible cuando se bloquea la resíntesis de PIP_2 por inhibidores de cinasas. Para responder esta pregunta se aplicó en el baño el inhibidor de cinasa wortmanina (10 μ M) (Nakanishi *et al.*, 1995). En primera instancia, se observó la recuperación de la I_M de su inhibición por Oxo-M en condiciones control ($82 \pm 9\%$, $n = 3$; Fig. 11A), y posteriormente, 5 min después de haber iniciado la exposición a wortmanina ($40 \pm 7\%$, $n = 2$; Fig. 11A). Las diferencias en el porcentaje de recuperación de la I_M bajo estas condiciones (Fig. 11E) coincidieron con lo reportado (Suh y Hille, 2002). De manera interesante, la recuperación de la I_M de la inhibición por IMI en presencia de wortmanina ($50 \pm 0.3\%$, $n = 5$; Fig. 11C) fue menor que la obtenida en condiciones control ($96 \pm 2\%$, $n = 5$; Fig. 11C), como se pudo constatar en el resumen de datos (Fig. 11E).

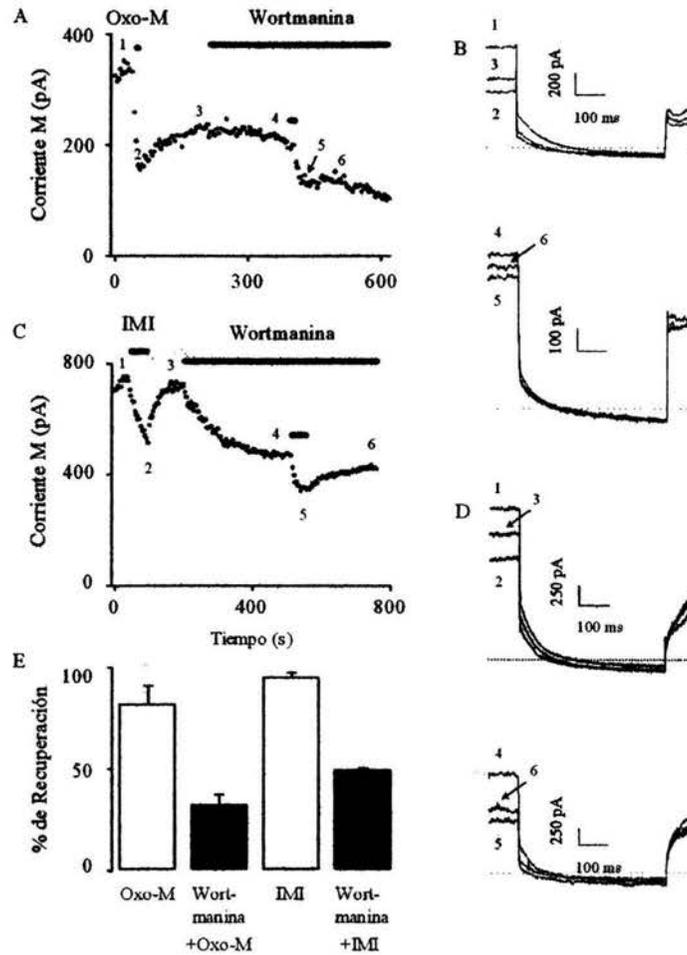


Fig. 11 Recuperación de la corriente M de la inhibición por oxotremorina-M e imipramina en presencia de wortmanina. (A) Inhibición y recuperación de la I_M por Oxo-M (10 μ M) en condiciones control y a los 5 min de haberse iniciado la aplicación de wortmanina (10 μ M). (B) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (A) antes (1, 2, 3) y después del inicio de la aplicación de wortmanina (4, 5, 6), en condiciones control (1, 4), en presencia de Oxo-M (2, 5) y durante el lavado (3, 6). (C) Inhibición y recuperación de la I_M por IMI (10 μ M) en condiciones control y a los 5 min de haberse iniciado la aplicación de wortmanina (10 μ M). (D) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (C) Resumen de los experimentos.

Con el fin de descartar efectos debidos a la desensibilización durante las aplicaciones sucesivas de la IMI, el experimento anterior se repitió en células independientes ($n = 4$). La recuperación de la I_M de su inhibición por IMI (10 μ M) en condiciones control fue de 82 % (Fig. 12A) y después de 5 min de haber empezado el tratamiento con wortmanina fue de 51% (Fig. 12B). Estos resultados confirmaron los resultados mostrados en la Fig. 11C

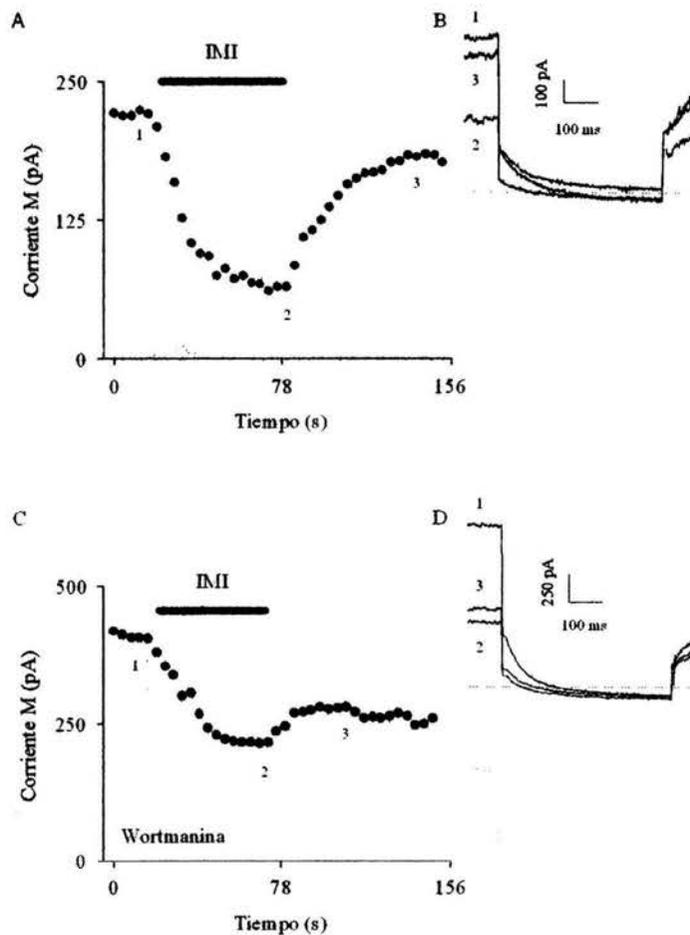


Fig. 12 Recuperación de la corriente M de la inhibición por imipramina en presencia de wortmanina en células independientes. (A) Inhibición y recuperación de la I_M por IMI (10 μM) en condiciones control. (B) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (A) antes (1), durante la aplicación de IMI (2) y durante el lavado (3). (C) Inhibición y recuperación de la I_M por IMI (10 μM) a los 5 min de haberse iniciado la aplicación de wortmanina (10 μM). (D) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (C) antes (1), durante la aplicación de IMI (2) y durante el lavado (3).

Dado que estos resultados apoyan la hipótesis de que la recuperación de la I_M de la inhibición por IMI requiere del reciclaje de los reservorios de PIP_2 sensibles al agonista, se prosiguió a demostrar mediante el uso de otra estrategia, la participación del PIP_2 en la respuesta inducida por IMI. Para tal motivo se dializaron las SCGs con el PIP_2 (182 μM) vía la pipeta de registro. Si la hidrólisis de PIP_2 fuera la base del efecto inducido por IMI en la I_M , se esperaría que la restauración de este fosfolípido vía la pipeta de registro previniera o

disminuyera el efecto de la IMI. En la Fig. 13B se observa con claridad la prevención significativa ($P < 0.05$) de la inhibición de la I_M por Oxo-M ($9.6 \pm 2\%$; $n = 10$) o IMI ($20.1 \pm 2\%$, $n = 13$) cuando se dializaron las células con PIP_2 , al compararla con el efecto inhibitorio control de dichas sustancias ($80.1 \pm 3\%$ para el Oxo-M, $20.1 \pm 2\%$ para la IMI; Fig. 13A).

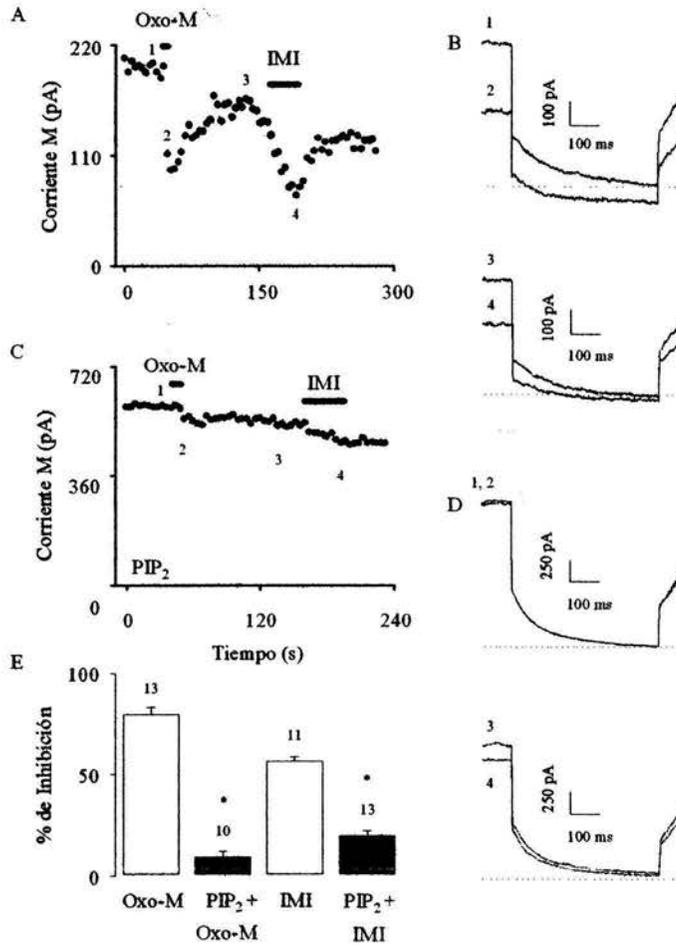


Fig. 13 Efecto de la imipramina sobre la corriente M bajo la aplicación intracelular de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato. (A) Inhibición de la I_M por Oxo-M ($10 \mu\text{M}$) e IMI ($10 \mu\text{M}$) en ausencia de PIP_2 en la pipeta de patch. (B) Trazos sobrepuestos de la I_M representativos de (A) en ausencia (1, 3) y en presencia de Oxo-M (2) e IMI (4). (C) Inhibición de la I_M por Oxo-M ($10 \mu\text{M}$) e IMI ($10 \mu\text{M}$) en presencia de PIP_2 ($182 \mu\text{M}$) en la pipeta de patch. (D) Resumen de los experimentos datos.

El resumen de estos experimentos es ilustrativo y consistente con las observaciones realizadas (Fig. 13E). Estos resultados apoyan la propuesta de que una disminución en las concentraciones de PIP_2 es la responsable de la inhibición de la I_M por IMI.

9. DISCUSIÓN

Existen evidencias experimentales que sugieren que el PIP₂ es el segundo mensajero que media la inhibición de la I_M inducida por agonistas. Así mismo, se ha reportado que los ATC promueven la actividad de sistemas de señalización intracelular en diversos tipos celulares (Joshi *et al.*, 1999). La IMI activa a la PLC y promueve la formación de fosfatos de inositol en neuronas cultivadas, rebanadas de corteza frontal (Fukuda *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1993), y en cilios olfativos de peces reconstituidos en bicapas lipídicas (Cadiou y Molle, 2003). Estos resultados descartan la posibilidad de que los efectos de la IMI sean exclusivos sobre receptores de membrana o transportadores de neurotransmisores. Por ello, en la presente tesis se planteó la posibilidad de que la IMI afectara a la I_M incidiendo en la cascada de señalización intracelular activada por receptor, la cual naturalmente regula a esta corriente.

9.1. LA IMIPRAMINA INHIBE AL CANAL M SIN CAMBIOS EN LA SENSIBILIDAD AL VOLTAJE

Hay algunas diferencias en cuanto a la afinidad con la cual la IMI inhibe distintos canales iónicos, pero en todos los casos reportados los valores del IC₅₀ se encuentran en el rango micromolar (1 a 30 μM). Así mismo, las curvas concentración-respuesta se ajustan bien a un coeficiente de Hill cercano a la unidad. El IC₅₀ aquí reportado (7 μM) fue similar al publicado para la corriente neuronal I_A (7 μM; Kuo, 1998) y el rectificador de K⁺ tardío (6.8 μM; Wooltorton y Mathie, 1993).

La similitud entre las afinidades de diversos canales iónicos por la IMI sugiere un mecanismo de acción similar en distintos canales de K⁺ (Wooltorton y Mathie, 1993). En pocos

casos, sin embargo, se ha estudiado en detalle el mecanismo de acción de la IMI. En la familia de los canales de K^+ , la mayor parte de la evidencia (García-Ferreiro *et al.*, 2004; Kuo, 1998; Woollorton y Mathie, 1993) indica que la IMI interactúa directamente con estos canales. Sin embargo no existe un acuerdo en cuanto a si la IMI se une desde el lado extracelular (Woollorton y Mathie, 1993; Kuo, 1998) o intracelular (García-Ferreiro *et al.*, 2004), y si lo hace estando el canal en estado cerrado o abierto (Teschmacher *et al.*, 1999). Aún más, para otro tipo de canales como el canal de Ca^{2+} tipo L se ha reportado (Choi *et al.*, 1992) la participación de una proteína G insensible a la PTX. Estas diferencias apuntan a que la IMI inhibe diversos canales mediante distintos mecanismos de acción.

De manera interesante el tiempo en que se desarrolla la inhibición (15 s) y la recuperación (20 s) de la I_M , la ausencia de desplazamiento en la dependencia de voltaje (Fig. 4) o de cambios en su cinética, son efectos que se asemejan a los obtenidos para la inhibición de la I_M por los agonistas muscarínicos (Adams *et al.*, 1982b; Marrion *et al.*, 1989) y el neuropéptido BC (Jones *et al.*, 1995; Haley *et al.*, 2000), que sugieren una posible similitud entre la vía de regulación utilizada por estos agonistas y la utilizada por la IMI.

9.2. LA IMIPRAMINA NEUTRA ES LA FORMA ACTIVA QUE INHIBE A LA CORRIENTE M

Utilizando la forma análoga, permanentemente cargada, de la amitriptilina (N-metilamitriptilina), Woollorton y Mathie (1995) argumentaron que la forma no protonada (no cargada) de los ATC representan la forma activa que inhibe a las corrientes de K^+ . En concordancia con este argumento, se encontró que la inhibición de la I_A por IMI depende del pH y se vuelve más pronunciada en soluciones alcalinas. Del mismo modo, se encontró que el

aumento del pH desde 7.4 a 8 favorece la reducción de la I_M por IMI (Fig. 6). Puesto que la solución externa alcalina en si misma no afecta a la I_M (Fig. 6D), se sugiere que el mayor efecto de la IMI a pH 8 proviene de un aumento en la concentración de la IMIn. Utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbach e IMI a una concentración nominal de 5 μ M, se estima que la concentración de IMIn a pH 7.4 y 8 es de 39.4 nM y 153.2 nM, respectivamente. El aumento de la IMIn incrementa el porcentaje de inhibición desde $45.4 \pm 3 \%$ a $76.9 \pm 2 \%$. Estos datos sugieren que la IMIn es la forma activa que inhibe a la I_M y que los enlaces iónicos no juegan un papel significativo en la interacción de la IMI con su sustrato. Estos resultados podrían dar luz sobre la estructura del receptor de la IMI.

9.3. LA IMIPRAMINA ATRAVIESA LA MEMBRANA PARA ACTIVAR A LA FOSFOLIPASA C E INHIBIR A LA CORRIENTE M

Actualmente se tiene claro que los agonistas que inhiben a la I_M activan receptores acoplados a proteínas G (Suh *et al.*, 2004). A diferencia de estos agonistas, la IMI parece estar actuando en un paso posterior a la activación de la proteína G o del receptor para inhibir a la I_M . La ausencia de cambios en la cinética de la desactivación y en la dependencia del tiempo de la I_M en presencia de la IMI sugieren un mecanismo distinto al bloqueo del canal abierto (Armstron y Bezanilla, 19977; Bezanilla y Armstron, 1977). En estudios preliminares del laboratorio se observó la permanencia del efecto de la IMI sobre la I_M en presencia de los antagonistas muscarínicos M_1 , M_4 . Así mismo, la Fig. 7C muestra que la diálisis de las SCGs con el inhibidor competitivo GDP β S no altera la inhibición de la I_M por IMI. El efecto inhibitorio de la IMI cuando se aplicó en la pipeta de registro (Fig. 5) y su mayor eficiencia en su forma neutra (Fig. 6) son resultados que también sugieren que

la acción de la IMI se encuentra en un paso posterior a la activación de la proteína G o de un receptor.

En concordancia con estos resultados, Fukuda *et al.* (1994) encontraron que la IMI activa directamente a la PLC β en neuronas cultivadas de corteza frontal de rata. Este antecedente lleva a plantear la posibilidad de que la IMI en las SCGs active a la PLC en forma directa. Las Figs.8E y 10E muestran que la inhibición de la PLC por el U73122 previene la inhibición de la I_M por IMI. Es posible, por lo tanto, que el fármaco ejerzca sus acciones inhibitorias sobre la I_M incidiendo sobre la cascada de señalización activada por receptores acoplados a proteínas G. De manera específica se sabe que el M₁AChR y el B₂R son capaces de estimular, vía una proteína G_{q/11} (Haley *et al.*, 2000), una PLC β diferente. El M₁AChR activa una PLC β_1 (Berstein *et al.*, 1992; Dippel *et al.*, 1996) y el B₂R activa una PLC β_4 (Haley *et al.*, 2000). Por consiguiente, la propuesta inicial de Fukuda *et al.* (1994) de que la IMI, en neuronas cultivadas de corteza frontal de rata, activa directamente a la PLC β_1 sin la mediación de un receptor o de una proteína G, concuerda con este escenario.

Dado que la activación de la PLC por BC requiere de Ca²⁺ (Cruzblanca *et al.*, 1998), la pregunta que surge es si la IMI promueve acciones intracelulares por el aumento de Ca²⁺ liberado desde reservorios internos sensibles a IP₃, como lo hace la BC (Cruzblanca *et al.*, 1998), o si al igual que los agonistas muscarínicos no altera la concentración de Ca²⁺ intracelular en las SCGs (Beech *et al.*, 1991). En los resultados (Fig. 9E) se observa que la IMI, a diferencia de la BC, inhibe a la I_M sin una dependencia del Ca²⁺. Este resultado coincide con la propuesta de Fukuda *et al.* (1994) de que la IMI activa una PLC β_1 sin

cambios en la sensibilidad de la PLC al Ca^{2+} e indican que la IMI incide sobre la vía muscarínica para inhibir a la I_M .

En conjunto estos resultados sugieren que la acción de la IMI se debe a que activa directamente a la PLC desde el interior celular. El paso de la IMI a través de la membrana es un mecanismo que se ha propuesto para el bloqueo del canal hEag1 (García-Ferreiro, *et al.*, 2004). En este trabajo se plantea que la forma neutra de la IMI es la que atraviesa la membrana. Para demostrarlo utilizaron la técnica de fijación de voltaje en configuración *cell-attach*. Bajo estas condiciones, en las que el fármaco únicamente puede acceder a los canales contenidos en el parche atravesando la membrana, encontraron que la IMI aplicada extracelularmente bloquea al canal. Así mismo, en experimentos en los que variaron el pH de la solución externa e interna en presencia de IMI observaron que la inhibición del canal era más eficiente cuando se aumentaba el pH extracelular, o se acidificaba el pH intracelular. Estos resultados los llevaron a sugerir que era la parte neutra de la IMI la que cruzaba la membrana y la cargada la que bloqueaba al canal.

De manera análoga se ha reportado que sustancias como la 4-aminopiridina y los anestésicos locales procaina y lidocaina atraviesan la membrana para inhibir al canal de K^+ rectificador entrante (Stephens *et al.*, 1994) y al canal de Na^+ (Hille, 2001) respectivamente. Estas sustancias, al igual que la IMI, tienen anillos aromáticos en su estructura química y un grupo amina. Los anillos aromáticos son los responsables principales de la liposolubilidad de estas moléculas y el grupo amina es el que determina la hidrosolubilidad de la molécula y su unión a proteínas plasmáticas. El pKa de los

anestésicos locales procaina (9.1) y lidocaina (7.9), y de la 4-aminopiridina (9.02) es semejante al de la IMI (9.5).

9.4. LA HIDRÓLISIS DEL FOSFATIDILINOSITOL 4,5-BISFOSFATO ES LA BASE DEL EFECTO DE LA IMIPRAMINA SOBRE LA CORRIENTE M

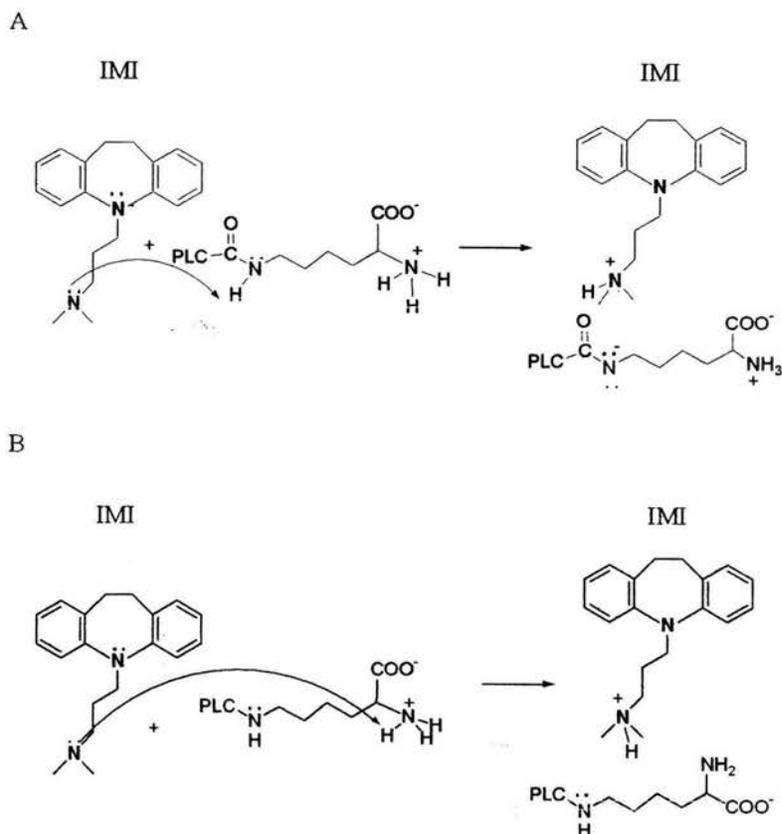
Después de una década de investigaciones, se propone al PIP_2 como el candidato más plausible que media la regulación del canal M. La hipótesis sugiere que la reducción de PIP_2 inducida por agonista es la responsable del cierre de los canales M (Suh y Hille, 2002; Winks *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003). Por ese motivo se probó si la inhibición de la resíntesis de PIP_2 y análogos podría alterar la respuesta a la IMI de la I_M . La Fig. 11 muestra que la wortmanina previene y enlentece la recuperación de la I_M de la inhibición por IMI, sugiriendo que se requiere de una PI-cinasa para la recuperación de la I_M . Se sabe que la wortmanina inhibe a la PI 3- y 4-cinasa, así como a la cinasa de la cadena ligera de miosina (Nakanishi *et al.*, 1995). La evidencia (Suh y Hille, 2002; Zhang *et al.*, 2003) sugiere que la PI 4-cinasa es la enzima que se requiere para la recuperación de la inhibición muscarínica de la I_M , particularmente para la fosforilación y la resíntesis de PIP_2 (Suh y Hille, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Esta observación fortalece la proposición de que la IMI estimula directamente a la PLC, que al activarse hidroliza al PIP_2 . En esta tesis se muestra evidencia de que se requiere de la resíntesis continua de PIP_2 para la recuperación de la I_M de la inhibición por IMI, en forma similar a como se ha propuesto que ocurre para la vía muscarínica M_1 . Por lo tanto, la elevación experimental de PIP_2 debería prevenir el efecto de la IMI sobre la I_M . Como se esperaba, la Fig. 13C muestra que la diálisis intracelular de PIP_2 suprime la inhibición de la I_M por IMI. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que una disminución en la concentración del PIP_2 en la

membrana es la señal que inhibe a la corriente de los KCNQ2/KCNQ3 (Suh y Hille, 2002; Winks *et al.*, 2005 Zhang *et al.*, 2003). Estos datos sugieren que el PIP₂ es un modulador directo de la actividad del canal M y que su hidrólisis causa la inhibición de dicha corriente.

9.5. LA IMIPRAMINA Y SU INTERACCIÓN CON LA FOSFOLIPASA C

Las conclusiones obtenidas concuerdan con la hipótesis propuesta de que la reducción de las concentraciones de PIP₂ inducida por agonista es la responsable del cierre de los canales M (Suh y Hille, 2002; Zhang *et al.*, 2003). El mecanismo preciso mediante el cual la IMI estimula a la PLC para inhibir a la I_M todavía queda sin esclarecer. Es tentador proponer una similitud entre el mecanismo de activación de la PLC por proteínas G y el del antidepresivo tricíclico IMI.

Ilkaeva *et al.* (2002) y Singer *et al.* (2002) plantean que una región de aminoácidos cargados, la más rica en residuos de lisina, de la terminal carboxilo de la PLCβ es la responsable de la activación de las proteínas Gαq. Con esto en mente, se pueden proponer las siguientes formas de interacción entre la PLC y la IMI. La primera, consiste en una interacción ácido-base, en donde el nitrógeno terciario de la cadena lateral de la IMI reacciona con el hidrógeno gama amino del residuo de lisina de la PLC, que por estar formando un enlace peptídico con otro aminoácido tiene cierta acidez. La otra posibilidad, es que ese mismo nitrógeno terciario de la IMI reaccione con el hidrógeno del nitrógeno alfa del residuo de lisina de la PLC, que por estar cargado positivamente está en posibilidad de perder un protón como se ilustra en la Esquema 11.



Esquema 11 Posibles formas de interacción entre la imipramina y la fosfolipasa C.

9.6. IMPLICACIONES CLÍNICAS

El efecto de la IMI sobre la I_M puede estar relacionado con su efecto terapéutico y/o sus efectos colaterales, dado que la concentración plasmática de este fármaco en los pacientes deprimidos alcanza hasta $\sim 2 \mu\text{M}$ (Hollister, 1982), y en el cerebro puede llegar a ser de 8-13 veces mayor (Besret *et al.*, 1996) al IC_{50} ($7 \mu\text{M}$) que se encontró en este trabajo de tesis.

La IMI al inhibir a la I_M (la cual hiperpolariza la célula alejándola del umbral de disparo) despolariza la célula. Esta despolarización, particularmente en las terminales

presinápticas, conduce a un aumento en la liberación de neurotransmisores como la serotonina, la dopamina y la noradrenalina de vesículas presentes en las neuronas presinápticas. A su vez la concentración de estos neurotransmisores aumenta en el espacio sináptico y podría explicar la mejoría clínica que experimenta el paciente deprimido.

Las SCGs de rata expresan una variedad de receptores (Boehm y Huck, 1997). Entre otros receptores, expresan receptores de serotonina (Pierce *et al.*, 1996), noradrenalina, dopamina (Sigala *et al.*, 2000), muscarina (Ramcharan *et al.*, 1996), nicotina (Voitenko *et al.*, 2001) e histamina (Ramcharan *et al.*, 1996). Por lo tanto y como se ha reportado en otras preparaciones a concentraciones menores dentro de la gama nanomolar es posible que la IMI interactúe con estos receptores (Cusack *et al.*, 1994; Golds *et al.*, 1980), a concentraciones nanomolares mayores con transportadores de aminas (Frazer, 1997; Owens *et al.*, 1997) y a concentraciones micromolares con canales iónicos como los de K^+ podría interactuar con algunos otros receptores como los nicotínicos (López-Valdés y García-Colunga, 2001) y con otros canales iónicos como los canales de K^+ .

10. CONCLUSIONES

Considerando todos los resultados obtenidos, se muestra, en un sistema nativo, evidencia de que el antidepresivo tricíclico IMI incide sobre la cascada de señalización intracelular que regula naturalmente a la I_M .

- 1) La inhibición de la I_M por IMI en las SCGs de rata es reversible, voltaje independiente y dependiente de la concentración, con un IC_{50} de 7 μ M.
- 2) La IMI neutra es más eficiente que su forma cargada para inhibir la I_M .
- 3) La inhibición se lleva a cabo en un paso posterior a la activación de los receptores membranales y de la proteína G.
- 4) La inhibición es resultado de la activación de la PLC.
- 5) La inhibición es resultado de la depleción de PIP_2 , y no de un mecanismo de bloqueo directo del canal M.

11. PERSPECTIVAS

El entendimiento de los sistemas de transducción de señales ha crecido de manera impresionante en años recientes como resultado de esfuerzos intensos para caracterizar la cascada de señalización que regula a la I_M en las neuronas.

Los experimentos presentados aquí proveen evidencia de que la inhibición de la I_M mediante la reducción de las concentraciones de PIP_2 inducida por el agonista, también puede llevarse a cabo por esta vía, a través del antidepressivo tricíclico IMI. La inhibición de la I_M mediante la activación directa de la PLC por la IMI puede ser una herramienta útil para ahondar en el estudio de la activación, regulación y participación de la PLC en esta vía de regulación. Además, la caracterización de la interacción entre la IMI y la PLC también es de interés farmacológico, y podría brindar información acerca de cuál es la región de la estructura de la IMI que interactúa con la PLC e ilustrar sobre regiones semejantes en otros ATC. Se sabe que pequeños cambios en la estructura de los ATC pueden tener efectos profundos en sus acciones. Por lo tanto, debería ser posible diseñar nuevos fármacos más selectivos conociendo también la secuencia de AA de la región de la PLC con la cuál interactúan. El diseño futuro de fármacos con acciones específicas sobre la PLC- β_1 y en el canal M serán de gran utilidad para la modulación de la excitabilidad neuronal.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams PR, Brown DA, Constanti A. M-currents and other potassium currents in bullfrog sympathetic neurones. *J Physiol* 330:537-572, 1982a.
- Adams PR, Brown DA, Constanti A. Pharmacological inhibition of the M-current. *J Physiol* 332:223-262, 1982b.
- Adams PR, Brown DA, Jones SW. Substance P inhibits the M-current in bullfrog sympathetic neurones. *Br J Pharmacol* 79:330-333, 1983.
- Adams PR, Brown DA. Synaptic inhibition of the M-current: slow excitatory post-synaptic potential mechanism in bullfrog sympathetic neurones. *J Physiol* 332:263-272, 1982.
- Adams PR, Constanti A, Brown DA, Clark RB. Intracellular Ca^{2+} activates a fast voltage-sensitive K^+ current in vertebrate sympathetic neurones. *Nature* 296:746-749, 1982c.
- Adams PR, Jones SW, Pennefather P, Brown DA, Koch C, Lancaster B. Slow synaptic transmission in frog sympathetic ganglia. *J Exp Biol*, 124:259-285, 1986.
- Aiken SP, Lampe BJ, Murphy PA, Brown BS. Reduction of spike frequency adaptation and blockade of M-current in rat CA1 pyramidal neurones by linopirdine (DuP 996), a neurotransmitter release enhancer. *Br J Pharmacol* 115:1163-1168, 1995.
- Aiken SP, Zaczek R, Brown BS. Pharmacology of the neurotransmitter release enhancer linopirdine (DuP 996), and insights into its mechanism of action. *Adv Pharmacol* 35:349-384, 1996.
- Akaike N, Sadoshima J. Caffeine affects four different ionic currents in the bull-frog sympathetic neurone. *J Physiol* 412:221-244, 1989.
- Akasu T, Tokimasa T. Cellular metabolism regulating H and M currents in bullfrog sympathetic ganglia. *Can J Physiol Pharmacol* 70:S51-55, 1992.
- Alaburda A, Perrier JF, Hounsgaard J. An M-like outward current regulates the excitability of spinal motoneurons in the adult turtle. *J Physiol*. 540:875-881, 2002.
- Amsterdam J, Brunswick D, Mendels J. The clinical application of tricyclic antidepressant pharmacokinetics and plasma levels. *Am J Psychiatry* 137:653-662, 1980.
- Armstrong CM, Bezanilla F. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol* 70:567-90, 1977.
- Banker G, Goslin K (1991) Primary dissociated cell cultures of neuronal tissue. En: Banker G, Goslin K (ed) *Culturing nerve cells*. The MIT Press, Cambridge, MA pp 41-73.
- Barbaccia ML, Gandolfi O, Chuang DM, Costa E. Modulation of neuronal serotonin uptake by a putative

endogenous ligand of imipramine recognition sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 5134-5138, 1983.

Bashor MM. Dispersion and disruption of tissues. *Methods Enzymol* 58:119-131, 1979.

Beech DJ, Bernheim L, Mathie A, Hille B. Intracellular Ca^{2+} buffers disrupt muscarinic suppression of Ca^{2+} current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 652-656, 1991.

Belluzzi O, Sacchi O, Wanke E. A fast transient outward current in the rat sympathetic neurone studied under voltage-clamp conditions. *J Physiol* 358:91-108, 1985a.

Belluzzi O, Sacchi O, Wanke E. Identification of delayed potassium and calcium currents in the rat sympathetic neurone under voltage clamp. *J Physiol* 358:109-129, 1985b.

Bennett MR, Middleton J. An electrophysiological analysis of the effects of amine-uptake blockers and alpha-adrenoceptor blockers on adrenergic neuromuscular transmission. *Br J Pharmacol* 55:87-95, 1975.

Bernheim L, Beech DJ, Hille B. A diffusible second messenger mediates one of the pathways coupling receptors to calcium channels in rat sympathetic neurons. *Neuron* 6: 859-867, 1991.

Bernheim L, Mathie A, Hille B. Characterization of muscarinic receptor subtypes inhibiting Ca^{2+} current and M current in rat

sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9544-9548, 1992.

Berstein G, Blank JL, Smrcka AV, Higashijima T, Sternweis PC, Exton JH, Ross EM. Reconstitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis using purified ml muscarinic receptor, G_{q11} , and phospholipase C- β_1 . *J Biol Chem* 267, 8081-8088, 1992.

Besret L, Debruyne D, Rioux P, Bonvalot T, Moulin M, Zarifian E, Baron JC. A comprehensive investigation of plasma and brain regional pharmacokinetics of imipramine and its metabolites during and after chronic administration in the rat. *J Pharm Sci* 85:291-295, 1996.

Bezanilla F, Armstrong CM. Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J Gen Physiol* 70:549-566, 1977.

Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279: 403-406, 1998.

Boehm S, Huck S. Receptors controlling transmitter release from sympathetic neurons in vitro. *Prog Neurobiol* 51:225-242; 1997.

Brown D (1988) M currents. En: Narahashi T (ed) Ion channels. Plenum Press, New York, pp 55-94.

Brown DA, Adams PR. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K^+ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283, 673-676, 1980.

- Brown DA, Constanti A. Intracellular observations on the effects of muscarinic agonists on rat sympathetic neurones. *Br J Pharmacol* 70:593-608, 1980.
- Brown DA, Higashida H. Voltage- and calcium-activated potassium currents in mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid cells. *J Physiol* 397, 149-165, 1989.
- Brown DA, Selyanko AA. Two components of muscarine-sensitive membrane current in rat sympathetic neurons. *J Physiol (Lond)* 358: 335-363, 1985.
- Brown DA, Buckley NJ, Caulfield MP, Duffy SM, Jones S, *et al.* 1995. Coupling of muscarinic acetylcholine receptors to neural ion channels: closure of K⁺ channels. In *Molecular Mechanisms of Muscarinic Acetylcholine Receptor Function*, ed. J Wess, pp. 165-80. Austin, TX: Landes.
- Brown DA, Constanti A, Adams PR. Ca-activated potassium current in vertebrate sympathetic neurons. *Cell Calcium* 4:407-420, 1983.
- Brown DA, Constanti A, Adams PR. Slow cholinergic and peptidergic transmission in sympathetic ganglia. *Fed Proc* 40:2625-2630, 1981.
- Brown DA, Constanti A. Intracellular observations on the effects of muscarinic agonists on rat sympathetic neurones. *Br J Pharmacol* 70:593-608, 1980.
- Brown DA, Marrion NV, Smart TG. On the transduction mechanism for muscarine-induced inhibition of M-current in cultured rat sympathetic neurones. *J Physiol* 413:469-488, 1989.
- Cadiou H, Molle G. Adenophostin A and imipramine are two activators of the olfactory inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channel in fish olfactory cilia. *Eur Biophys J* 32:106-1012, 2003.
- Casis O, Sanchez-Chapula JA. Mechanism of block of cardiac transient outward K⁺ current I_{to} by antidepressant drugs. *J Cardiovasc Pharmacol* 32:527-534, 1998.
- Castaldo P, del Giudice EM, Coppola G, Pascotto A, Annunziato L, Tagliatela M. Benign familial neonatal convulsions caused by altered gating of KCNQ2/KCNQ3 potassium channels. *J Neurosci* 22:RC199, 2002.
- Caulfield MP, Jones S, Vallis Y, Buckley NJ, Kim GD, Milligan G, Brown DA. Muscarinic M-current inhibition via G_{αq/11} and α-adrenoceptor inhibition of Ca²⁺ current via G_{αo} in rat sympathetic neurones. *J Physiol* 477: 415-4122, 1994.
- Colino A, Halliwell JV. Carbachol potentiates Q current and activates a calcium-dependent non-specific conductance in rat hippocampus in vitro. *Eur J Neurosci* 5:1198-1209; 1993.
- Connor JA, Stevens CF. Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J Physiol* 213:31-53, 1971.

Constanti A, Brown DA. M-Currents in voltage-clamped mammalian sympathetic neurones. *Neurosci Lett* 24:289-294, 1981.

Constanti A, Sim JA. Muscarinic receptors mediating suppression of the M-current in guinea-pig olfactory cortex neurones may be of the M2-subtype. *Br J Pharmacol* 90:3-5; 1987.

Cooper EC, Aldape KD, Abosch A, Barbaro NM, Berger MS, Peacock WS, Jan YN, Jan LY. Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4914-4919, 2000.

Cooper EC, Harrington E, Jan YN, Jan LY. M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain. *J Neurosci* 21:9529-9540, 2001.

Cooper EC, Jan LY. Ion channel genes and human neurological disease: recent progress, prospects, and challenges. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4759-4766, 1999.

Costa AM, Brown BS. Inhibition of M-current in cultured rat superior cervical ganglia by linopirdine: mechanism of action studies. *Neuropharmacology* 36:1747-1753, 1997.

Cruzblanca H, Koh DS, Hille B. Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca^{2+} release from IP_3 -sensitive Ca^{2+} stores in rat

sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:7151-7156, 1998.

Cuellar-Quintero JL, Garcia DE, Cruzblanca H. The antidepressant imipramine inhibits the M-type K^+ current in rat sympathetic neurons. *Neuroreport* 12:2195-2198, 2001.

Cusack B, Nelson A, Richelson E. Binding of antidepressants to human brain receptors: focus on newer generation compounds. *Psychopharmacology (Berl)* 114:559-565, 1994.

Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, Leppert M. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 18:53-55, 1998.

Charpak S, Gahwiler BH. Glutamate mediates a slow synaptic response in hippocampal slice cultures. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 243:221-226, 1991.

Chen H, Kureny DE, Smith PA. Heparin prevents M-current over-recovery but not M-current suppression in bullfrog sympathetic ganglion neurones. *Brain Res* 625:323-327, 1993.

Choi JJ, Huang GJ, Shafik E, Wu WH, McArdle JJ. Imipramine's selective suppression of an L-type calcium channel in neurons of murine dorsal root ganglia involves G proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 263:49-53, 1992.

Delmas P, Brown DA, Dayrell M, Abogadie FC, Caulfield MP, Buckley NJ. On the role of endogenous G-

- protein beta gamma subunits in N-type Ca^{2+} current inhibition by neurotransmitters in rat sympathetic neurones. *J Physiol* 506:319-329, 1998.
- Delmas P, Crest M, Brown DA. Functional organization of PLC signaling microdomains in neurons. *Trends Neurosci* 27:41-47, 2004.
- Delmas P, Wanaverbecq N, Abogadie FC, Mistry M, Brown DA. Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated $InsP_3$ pathways in neurons. *Neuron* 34:209-220, 2002.
- Delpon E, Tamargo J, Sanchez-Chapula J. Effects of imipramine on the transient outward current in rabbit atrial single cells. *Br J Pharmacol* 106:464-469, 1992.
- Dippel E, Kalkbrenner F, Wittig B, Schultz G. A heterotrimeric G protein complex couples the muscarinic m1 receptor to phospholipase C- β . *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1391-1396, 1996.
- Dorje F, Levey AI, Brann MR. Immunological detection of muscarinic receptor subtype proteins (m1-m5) in rabbit peripheral tissues. *Mol Pharmacol* 40:459-462, 1991.
- Dreixler JC, Bian J, Cao Y, Roberts MT, Roizen JD, Houamed KM. Block of rat brain recombinant SK channels by tricyclic antidepressants and related compounds. *Eur J Pharmacol* 28:1-7, 2000.
- Enna SJ, Kendall DA. Interaction of antidepressants with brain neurotransmitters receptors. *J Clin Psychopharmacol* 1:12S-16S, 1981.
- Fletcher JE, Lindorfer MA, DeFilippo JM, Yasuda H, Guilford M, Garrison JC. The G protein β_5 subunit interacts selectively with the G_{α_q} subunit. *J Biol Chem* 273:636-644, 1998.
- Ford CP, Stemkowski PL, Light PE, Smith PA. Experiments to test the role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in neurotransmitter-induced M-channel closure in bullfrog sympathetic neurons. *J Neurosci* 23:4931-4941, 2003.
- Frazer A. Pharmacology of antidepressants. *J Clin Psychopharmacol* Suppl 1:2S-18S, 1997.
- Fukuda H, Nishida A, Saito H, Shimizu M, Yamawaki S. Imipramine stimulates phospholipase C activity in rat brain. *Neurochem Int* 25:567-571, 1994.
- Gamper N, Reznikov V, Yamada Y, Yang J, Shapiro MS. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signals underlie receptor-specific $G_{q/11}$ -mediated modulation of N-type Ca^{2+} channels. *J Neurosci* 24:10980-10992, 2004.
- Gamper N, Shapiro MS. Calmodulin mediates Ca^{2+} -dependent modulation of M-type K^+ channels. *J Gen Physiol* 122:17-31, 2003.
- Gamper N, Stockand JD, Shapiro MS. Subunit-specific modulation of KCNQ potassium channels by Src tyrosine kinase. *J Neurosci* 23:84-95, 2003.

- García DE, Li B, Garcia-Ferreiro RE, Hernandez-Ochoa EO, Yan K, Gautam N, Catterall WA, Mackie K, Hille B. G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca²⁺ channels. *J Neurosci* 18:9163-9170, 1998.
- García-Ferreiro RE, Kerschensteiner D, Major F, Monje F, Stühmer W, Pardo LA. Mechanism of Block of hEag1 K⁺ Channels by Imipramine and Astemizole. *J Gen Physiol*, 124: 301-317, 2004.
- Gavrilova-Ruch O, Schonherr K, Gessner G, Schonherr R, Klapperstuck T, Wohlrab W, Heinemann SH. Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *J Membr Biol* 188:137-149, 2002.
- Golds PR, Przyslo FR, Strange PG. The binding of some antidepressant drugs to brain muscarinic acetylcholine receptors. *Br J Pharmacol* 68:541-549, 1980.
- Green JP, Maayani S. Tricyclic antidepressant drugs block histamine H₂ receptor in brain. *Nature* 269:163-165, 1977.
- Habuchi Y, Furukawa T, Tanaka H, Tsujimura Y, Yoshimura M. Block of Na⁺ channels by imipramine in guinea-pig cardiac ventricular cells. *J Pharmacol Exp Ther* 256:1072-1081, 1991.
- Haley JE, Abogadie FC, Delmas P, Dayrell M, Vallis Y, Milligan G, Caulfield MP, Brown DA, Buckley NJ. The alpha subunit of Gq contributes to muscarinic inhibition of the M-type potassium current in sympathetic neurons. *J Neurosci* 18:4521-4531, 1998.
- Haley JE, Abogadie JM, Fernandez-Fernandez JM, Dayrell M, Vallis Y, Buckley NJ, Brown D. Bradykinin, but not muscarinic, inhibition of M-current in rat sympathetic ganglion neurons involves phospholipase C-β4. *J Neurosci* 20:3-5, 2000.
- Halliwel JV, Adams PR. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res* 250:71-92, 1982.
- Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, Idzerda RL, Nathanson NM. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13311-13316, 1997.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakman B, Sigworth FJ. Improves patch-clamp techniques for high resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:85-100, 1981.
- Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA. Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:258-262, 1996.
- Hermann A, Gorman AL. Blockade of voltage-dependent and Ca²⁺-dependent K⁺ current components by internal Ba²⁺ in molluscan pacemaker neurons. *Experientia* 35:229-231, 1979.
- Higgins D, Lein PJ, Osterhout DJ, Johnson MI (1992) Tissue culture of mammalian autonomic neurons. En:

- Banker G, Goslin K (ed) Culturing nerve cells. The MIT Press, Cambridge, MA pp 177-205.
- Hilgemann DW, Ball R. Regulation of cardiac Na^+ , Ca^{2+} exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP_2 . *Science* 273:956-959, 1996.
- Hille B. (2001) Ion channels of excitable membrane. En: Potassium channels and chloride channels. Sinawer Associates, Sunderland, MA pp 131-168.
- Hille B. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 17:531-536, 1994.
- Hollister LE. Plasma concentrations of tricyclic antidepressants in clinical practice. *J Clin Psychiatry* 43:66-69, 1982.
- Horn AS, Coyle JT, Snyder SH. Catecholamine uptake by synaptosomes from rat brain. Structure-activity relationships of drugs with differential effects on dopamine and norepinephrine neurons. *Mol Pharmacol* 7:66-80, 1971.
- Hoshi N, Zhang JS, Omaki M, Takeuchi T, Yokoyama S, Wanaverbecq N, Langeberg LK, Yoneda Y, Scott JD, Brown DA, Higashida H. AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists. *Nat Neurosci* 6:564-571, 2003.
- Huang CL, Feng S, Hilgemann DW. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP_2 and its stabilization by $\text{G}\beta\gamma$. *Nature* 391:803-806, 1998.
- Ikeda SR, Dunlap K. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: role of G protein subunits. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33:131-151, 1999.
- Ikeda SR. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:255-258, 1996.
- Ilkaeva O, Kinch LN, Paulssen RH, Ross EM. Mutations in the carboxyl-terminal domain of phospholipase C-beta 1 delineate the dimer interface and a potential $\text{G}\alpha_q$ interaction site. *J Biol Chem* 277(6):4294-4300, 2002.
- Jones S, Brown DA, Milligan G, Willer E, Buckley NJ, Caulfield MP. Bradykinin excites rat sympathetic neurons by inhibition of M current through a mechanism involving B_2 receptors and $\text{G}\alpha_{q/11}$. *Neuron* 14:399-405, 1995.
- Joshi GP, Singh A, Ravichandra B. High concentration of tricyclic antidepressants increase intracellular Ca^{2+} in cultured neural cells. *Neurochem Res* 24:391-398, 1999.
- Kirkwood A, Simmons MA, Mather RJ, Lisman J. Muscarinic suppression of the M-current is mediated by a rise in internal Ca^{2+} concentration. *Neuron* 6:1009-1014, 1991.
- Kobrinisky E, Mirshahi T, Zhang H, Jin T, Logothetis DE. Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger PIP_2 leads to K^+

current desensitization. *Nat Cell Biol* 2:507-514, 2000.

Koketsu K, Akasu T, Miyagawa M. Identification of gK systems activated by $[Ca^{2+}]$. *Brain Res* 243:369-372, 1982.

Kuba K. Release of calcium ions linked to the activation of potassium conductance in a caffeine-treated sympathetic neurone. *J Physiol* 298:251-269, 1980.

Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lutjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch TJ. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96:437-446, 1999.

Kuo CC. Imipramine inhibition of transient K^+ current: an external open channel blocker preventing fast inactivation. *Biophys J* 75:2845-2857, 1998.

Kurenyi DE, Chen H, Smith PA. Low concentrations of muscarine potentiate M-current in bullfrog sympathetic B-neurons. *J Auton Nerv Syst* 67:89-96, 1997.

Lamas JA, Reboreda A, Codesido V. Ionic basis of the resting membrane potential in cultured rat sympathetic neurons. *Neuroreport* 13:585-591, 2002.

Lamas JA, Selyanko AA, Brown DA. Effects of a cognition-enhancer, linopirdine (DuP 996), on M-type potassium currents (I_{KM}) and some other voltage- and ligand-gated membrane currents in rat sympathetic

neurons. *Eur J Neurosci* 9:605-616, 1997.

Lamas JA. A hyperpolarization-activated cation current (I_h) contributes to resting membrane potential in rat superior cervical sympathetic neurones. *Pflugers Arch* 436(3):429-435, 1998.

Lamas JA. The role of calcium in M-current inhibition by muscarinic agonists in rat sympathetic neurons. *Neuroreport* 10:2395-2400, 1999.

Lee SB, Rhee SG. Significance of PIP_2 hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes. *Curr Opin Cell Biol* 7:183-189, 1995.

Lerche C, Scherer CR, Seeböhm G, Derst C, Wei AD, Busch AE, Steinmeyer K. Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J Biol Chem* 275:22395-22400, 2000.

Lewis DL, Ikeda SR. Inhibition of M-type K^+ and N-type Ca^{2+} channels by the human gonadotropin-releasing-hormone receptor heterologously expressed in adult neurons. *Neuroendocrinology* 66(4):235-245, 1997.

Lindorfer MA, Myung CS, Savino Y, Yasuda H, Khazan R, Garrison JC. Differential activity of the G protein $\beta_5\gamma_2$ subunit at receptors and effectors. *J Biol Chem* 273: 34429-34436, 1998.

Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P (2000) Cell-to-cell signaling: hormones and receptors. En: *Molecular cell biology*. W. H. Freeman & Co, New York.

- Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE. The β subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K^+ channel in heart. *Nature* 325:321-326, 1987.
- Lopez HS. Kinetics of G protein-mediated modulation of the potassium M-current in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* 8(4):725-736, 1992.
- López-Valdés HE, García-Colunga J. Antagonism of nicotinic acetylcholine receptors by inhibitors of monoamine uptake. *Mol Psychiatry* 6:511-519, 2001.
- Loussouarn G, Park KH, Bellocq C, Baro I, Charpentier F, Escande D. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP_2 , controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K^+ channels. *EMBO J* 22:5412-5421, 2003.
- Maier U, Babich A, Macrez N, Leopoldt D, Gierschik P, Illenberger D, Nurnberg B. $G\beta\gamma_2$ is a highly selective activator of phospholipid-dependent enzymes. *J Biol Chem* 275:13746-13754, 2000.
- Main MJ, Cryan JE, Dupere JR, Cox B, Clare JJ, Burbidge SA. Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine. *Mol Pharmacol* 58:253-262, 2000.
- Marcusson JO, Backstrom IT, Ross SB. Single-site model of the neuronal 5-hydroxytryptamine uptake and imipramine-binding site. *Mol Pharmacol* 30:121-128, 1986.
- Marrion NV, Adams PR. Release of intracellular calcium and modulation of membrane currents by caffeine in bull-frog sympathetic neurones. *J Physiol* 445:515-535, 1992.
- Marrion NV, Smart TG, Brown DA. Membrane currents in adult rat superior cervical ganglia in dissociated tissue culture. *Neurosci Lett* 77:55-60, 1987.
- Marrion NV, Smart TG, Marsh SJ, Brown DA. Muscarinic suppression of the M-current in the rat sympathetic ganglion is mediated by receptors of the M_1 -subtype. *Br J Pharmacol* 98:557-573, 1989.
- Marrion NV, Zucker RS, Marsh SJ, Adams PR. Modulation of M-current by intracellular Ca^{2+} . *Neuron* 6(4):533-545, 1991.
- Marrion NV. Control of M-current. *Annu Rev Physiol* 59:483-504, 1997.
- Marrion NV. M-current suppression by agonist and phorbol ester in bullfrog sympathetic neurons. *Pflugers Arch* 426:296-303, 1994.
- Marrion NV. Selective reduction of one mode of M-channel gating by muscarine in sympathetic neurons. *Neuron* 11:77-84, 1993.
- Mirshahi T, Jin T, Logothetis DE. $G\beta\gamma$ and KACH: old story, new insights. *Sci STKE* 2003:PE32, 2003.
- Munakata M, Akaike N. Theophylline affects three different potassium currents in dissociated rat cortical neurones. *J Physiol* 471:599-616, 1993.

Nakanishi S, Catt KJ, Balla T. A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5317-5321, 1995.

Nicholson GM, Blanche T, Mansfield K, Tran Y. Differential blockade of neuronal voltage-gated Na⁺ and K⁺ channels by antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol* 452:35-48, 2002.

Nomura S, Zorn SH, Enna SJ. Selective interaction of tricyclic antidepressants with a subclass of rat brain cholinergic muscarinic receptors. *Life Sci* 40:1751-1760, 1987.

North RA, Tokimasa T. Depression of calcium-dependent potassium conductance of guinea-pig myenteric neurones by muscarinic agonists. *J Physiol* 342:253-266, 1983.

Ogata N, Narahashi T. Block of sodium channels by psychotropic drugs in single guinea-pig cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 97:905-913, 1989.

Ogata N, Yoshii M, Narahashi T. Psychotropic drugs block voltage-gated ion channels in neuroblastoma cells. *Brain Res* 476:140-144, 1989.

Owens MJ, Morgan WN, Plott SJ, Nemeroff CB. Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *J Pharmacol Exp Ther* 283:1305-1322, 1997.

Pennefather P, Lancaster B, Adams PR, Nicoll RA. Two distinct Ca-

dependent K currents in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3040-3044, 1985.

Pfaffinger P. Muscarine and t-LHRH suppress M-current by activating an IAP-insensitive G-protein. *J Neurosci* 8:3343-3353, 1988.

Pierce PA, Xie GX, Levine JD, Peroutka SJ. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 70:553-559, 1996.

Quintero JL, Arenas MI, Garcia DE. The antidepressant imipramine inhibits M current by activating a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-dependent pathway in rat sympathetic neurones. *Br J Pharmacol* 145:837-843, 2005.

Rae J, Cooper K, Gates P, Watsky M. Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* 37:15-26, 1991.

Ramcharan EJ, Matthews MR. Autoradiographic localization of functional muscarinic receptors in the rat superior cervical sympathetic ganglion reveals an extensive distribution over non-synaptic surfaces of neuronal somata, dendrites and nerve endings. *Neuroscience* 71:797-832, 1996.

Richelson E. Tricyclic antidepressants block histamine H₁ receptors of mouse neuroblastoma cells. *Nature* 274:176-177, 1978.

- Robbins J, Trouslard J, Marsh SJ, Brown DA. Kinetic and pharmacological properties of the M-current in rodent neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J Physiol* 451:159-85, 1992.
- Roche JP, Westenbroek R, Sorom AJ, Hille B, Mackie K, Shapiro MS. Antibodies and a cysteine-modifying reagent show correspondence of M current in neurons to KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels. *Br J Pharmacol* 137:1173-1186, 2002.
- Rundfeldt C, Netzer R. The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits. *Neurosci Lett* 282:73-76, 2000.
- Schnee ME, Brown BS. Selectivity of linopirdine (DuP 996), a neurotransmitter release enhancer, in blocking voltage-dependent and calcium-activated potassium currents in hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 286:709-717, 1998.
- Schofield GG, Ikeda SR. Potassium currents of acutely isolated adult rat superior cervical ganglion neurons. *Brain Res* 485:205-214, 1989.
- Schofield GG, Ikeda SR. Sodium and calcium currents of acutely isolated adult rat superior cervical ganglion neurons. *Pflugers Arch* 411:481-490, 1988.
- Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, Jentsch TJ. Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* 396: 687-690, 1998.
- Schulman JA, Weight FF. Synaptic transmission: long-lasting potentiation by a postsynaptic mechanism. *Science* 194:1437-1439, 1976.
- Selyanko AA, Brown DA. Intracellular calcium directly inhibits potassium M channels in excised membrane patches from rat sympathetic neurons. *Neuron* 16:151-162, 1996.
- Selyanko AA, Hadley JK, Wood IC, Abogadie FC, Delmas P, Buckley NJ, London B, Brown DA. Two types of K⁺ channel subunit, Erg1 and KCNQ2/3, contribute to the M-like current in a mammalian neuronal cell. *J Neurosci* 19:7742-7756, 1999.
- Selyanko AA, Hadley JK, Wood IC, Abogadie FC, Jentsch TJ, Brown DA. Inhibition of KCNQ1-4 potassium channels expressed in mammalian cells via M₁ muscarinic acetylcholine receptors. *J Physiol* 522 Pt 3:349-355, 2000.
- Selyanko AA, Stansfeld CE, Brown DA. Closure of potassium M-channels by muscarinic acetylcholine-receptor stimulants requires a diffusible messenger. *Proc Biol Sci* 250:119-125, 1992.
- Shalaby FY, Levesque PC, Yang WP, Little WA, Conder ML, Jenkins-West T, Blannar MA. Dominant-negative KvLQT1 mutations underlie the LQT1 form of long QT syndrome. *Circulation* 96:1733-1736, 1997.
- Shapiro MS, Gomeza J, Hamilton SE, Hille B, Loose MD, Nathanson NM, Roche JP, Wess J. Identification of subtypes of muscarinic receptors that regulate Ca²⁺ and K⁺ channel activity

in sympathetic neurons. *Life Sci* 68:2481-2487, 2001.

Shapiro MS, Roche JP, Kaftan EJ, Cruzblanca H, Mackie K, Hille B. Reconstitution of muscarinic modulation of the KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels that underlie the neuronal M current. *J Neurosci* 20(5):1710-1721, 2000.

Shapiro MS, Wollmuth LP, Hille B. Angiotensin II inhibits calcium and M current channels in rat sympathetic neurons via G proteins. *Neuron* 12:1319-1329, 1994.

Shapiro MS. Why biophysicists make models: quantifying modulation of the M current. *J Gen Physiol* 123:657-662, 2004.

Shimizu M, Nishida A, Yamawaki S. Antidepressants inhibit spontaneous oscillations of intracellular Ca²⁺ concentration in rat cortical cultured neurons. *Neurosci Lett* 146:101-104, 1993.

Sigala S, Missale C, Tognazzi N, Spano P. Differential gene expression of dopamine D-2 receptor subtypes in rat chromaffin cells and sympathetic neurons in culture. *Neuroreport* 11:2467-2471, 2000.

Singer AU, Waldo GL, Harden TK, Sondek J. A unique fold of phospholipase C- β mediates dimerization and interaction with G α_q . *Nat Struct Biol* 9:32-36, 2002.

Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D,

Rosales TO, Peiffer A, Anderson VE, Leppert M. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 18:25-29, 1998.

Soejima M, Noma A. Mode of regulation of the ACh-sensitive K-channel by the muscarinic receptor in rabbit atrial cells. *Pflugers Arch* 400:424-431, 1984.

Somogyi GT, Perel JM. Antagonism by tricyclic antidepressants of the muscarinic receptors located on the adrenergic nerve endings in rabbit heart atrium. *J Pharmacol Exp Ther* 251:922-928, 1989.

Sorensen SD, Linseman DA, McEwen EL, Heacock AM, Fisher SK. A role for a wortmannin-sensitive phosphatidylinositol-4-kinase in the endocytosis of muscarinic cholinergic receptors. *Mol Pharmacol* 53:827-836, 1998.

Stansfeld CE, Marsh SJ, Gibb AJ, Brown DA. Identification of M-channels in outside-out patches excised from sympathetic ganglion cells. *Neuron* 10:639-654, 1993.

Stephens GJ, Garratt JC, Robertson B, Owen DG. On the mechanism of 4-aminopyridine action on the cloned mouse brain potassium channel mKv1.1. *J Physiol* 477 (Pt 2):187-196, 1994.

Storm JF. An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 409:171-190, 1989.

Suh BC, Hille B. Recovery from muscarinic modulation of M current

- channels requires phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Synthesis. *Neuron* 35:507-520, 2002.
- Suh BC, Horowitz LF, Hirdes W, Mackie K, Hille B. Regulation of KCNQ2/KCNQ3 current by G protein cycling: the kinetics of receptor-mediated signaling by G_q. *J Gen Physiol* 123:663-683, 2004.
- Sui JL, Petit-Jacques J, Logothetis DE. Activation of the atrial KACH channel by the betagamma subunits of G proteins or intracellular Na⁺ ions depends on the presence of phosphatidylinositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1307-1312, 1998.
- Tatulian L, Delmas P, Abogadie FC, Brown DA. Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine. *J Neurosci* 21:5535-5545, 2001.
- Terstappen GC, Pula G, Carignani C, Chen MX, Roncarati R. Pharmacological characterization of the human small conductance calcium-activated potassium channel hSK3 reveals sensitivity to tricyclic antidepressants and antipsychotic phenothiazines. *Neuropharmacology* 40:772-783, 2001.
- Teschmacher AG, Seward EP, Hancox JC, Witchel HJ. Inhibition of the current of heterologously expressed HERG potassium channels by imipramine and amitriptyline. *Br J Pharmacol* 128:479-485, 1999.
- Tinel N, Lauritzen I, Chouabe C, Lazdunski M, Borsotto M. The KCNQ2 potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with KCNQ3. *FEBS Lett* 438:171-176, 1998.
- Tokimasa T, Akasu T. Extracellular calcium ions are required for muscarine-sensitive potassium current in bullfrog sympathetic neurons. *J Auton Nerv Syst* 29(2):163-174, 1990.
- Tokimasa T. Intracellular Ca²⁺ ions inactivate K⁺ current in bullfrog sympathetic neurons. *Brain Res* 337:386-391, 1985.
- Tosaka T, Tasaka J, Miyazaki T, Libet B. Hyperpolarization following activation of K⁺ channels by excitatory postsynaptic potentials. *Nature* 305:148-150, 1983.
- U'Prichard DC, Greenberg DA, Sheehan PP, Snyder SH. Tricyclic antidepressants: therapeutic properties and affinity for alpha-noradrenergic receptor binding sites in the brain. *Science* 199:197-198, 1978.
- Valenzuela C, Sanchez-Chapula J, Delpon E, Elizalde A, Perez O, Tamargo J. Imipramine blocks rapidly activating and delays slowly activating K⁺ current activation in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 74:687-699, 1994.
- Villarroel A. On the role of arachidonic acid in M-current modulation by muscarine in bullfrog sympathetic neurons. *J Neurosci* 14:7053-7066, 1994.
- Villarroel A. Progression of M-current inhibition after agonist

- removal. *J Neurophysiol* 75:518-521, 1996.
- Voitenko LP, Voitenko SV, Skok MV, Purnyn HE, Skok VI. Nicotinic acetylcholine receptor subtypes in rat superior cervical ganglion neurons as studied by sequential application of two alpha-subunit-specific antibodies. *Neurosci Lett* 303:37-40, 2001.
- Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282:1890-1893, 1998.
- Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12:17-23, 1996.
- Wanke E, Ferroni A, Malgaroli A, Ambrosini A, Pozzan T, Meldolesi J. Activation of a muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca^{2+} current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4313-4317, 1987.
- Weinshenker, D., Wei, A., Salkoff, L. & Thomas, J.H. Block of an ether-a-go-go-like K^+ channel by imipramine rescues egl-2 excitation defects in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 19:9831-9840, 1999.
- Wickenden AD, Yu W, Zou A, Jegla T, Wagoner PK. Retigabine, a novel anti-convulsant, enhances activation of KCNQ2/Q3 potassium channels. *Mol Pharmacol* 58:591-600, 2000.
- Willars GB, Nahorski SR, Challiss RA. Differential regulation of muscarinic acetylcholine receptor-sensitive polyphosphoinositide pools and consequences for signaling in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 273:5037-5046, 1998.
- Winks JS, Hughes S, Filippov AK, Tatulian L, Abogadie FC, Brown DA, Marsh SJ. Relationship between membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and receptor-mediated inhibition of native neuronal M channels. *J Neurosci* 25:3400-3413, 2005.
- Womble MD, Moises HC. Muscarinic inhibition of M-current and a potassium leak conductance in neurones of the rat basolateral amygdala. *J Physiol* 457:493-114, 1992.
- Wooltorton JR, Mathie A. Block of potassium currents in rat isolated sympathetic neurones by tricyclic antidepressants and structurally related compounds. *Br J Pharmacol* 110:1126-1132, 1993.
- Wooltorton JR, Mathie A. Potent block of potassium currents in rat isolated sympathetic neurones by the uncharged form of amitriptyline and related tricyclic compounds. *Br J Pharmacol* 116:2191-2200, 1995.
- Wu D, Jiang H, Katz A, Simon MI. Identification of critical regions on phospholipase C-beta 1 required for activation by G-proteins. *J Biol Chem* 268: 3704-3709, 1993.

Wu DQ, Lee CH, Rhee SG, Simon MI. Activation of phospholipase C by the alpha subunits of the Gq and G11 proteins in transfected Cos-7 cells. *J Biol Chem* 267:1811-1817, 1992.

Xie LH, Horie M, Takano M. Phospholipase C-linked receptors regulate the ATP-sensitive potassium channel by means of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:15292-15297, 1999.

Yang WP, Levesque PC, Little WA, Conder ML, Ramakrishnan P, Neubauer MG, Blonar MA. Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *J Biol Chem* 273:19419-19423, 1998.

Yang YC, Kuo CC. Inhibition of Na⁺ current by imipramine and related compounds: different binding kinetics as an inactivation stabilizer and as an open channel blocker. *Mol Pharmacol* 62:1228-1237, 2002.

Yu SP, O'Malley DM, Adams PR. Regulation of M current by intracellular calcium in bullfrog sympathetic ganglion neurons. *J Neurosci* 14:3487-3499, 1994.

Yus-Nájera E., Santana-Castro I, Villarroel A. The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage dependent KCNQ potassium channels. *J Biol Chem* 277:28545-53, 2002.

Zaczek R, Chorvat RJ, Saye JA, Pierdomenico ME, Maciag CM,

Logue AR, Fisher BN, Rominger DH, Earl RA. Two new potent neurotransmitter release enhancers, 10,10-bis(4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone and 10,10-bis(2-fluoro-4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone: comparison to linopirdine. *J Pharmacol Exp Ther* 285:724-730, 1998.

Zhang H, Craciun LC, Mirshahi T, Rohács T, Lopes CMB, Jin T, Logothetis DE. PIP₂ activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 37:963-975, 2003.

Zhang H, He C, Yan X, Mirshahi T, Logothetis DE. Activation of inwardly rectifying K⁺ channels by distinct PtdIns(4,5)P₂ interactions. *Nat Cell Biol* 1:183-188, 1999.

The antidepressant imipramine inhibits M current by activating a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-dependent pathway in rat sympathetic neurones

¹Jania L. Quintero, ¹Maria Isabel Arenas & ^{*,1}David E. García

¹Department of Physiology, Faculty of Medicine, UNAM, Apdo. Post. 70250, CP 04510 México, DF, México

1 Little is known about the intracellular actions of imipramine (IMI) in the regulation of ion channels. We tested the action of IMI on the intracellular cascade that regulates M current (I_M) in superior cervical ganglion neurones (SCGs).

2 Dialysis of the cells with GDP β S, a G protein signaling blocker, did not disrupt the inhibition of I_M .

3 When we incubated the cells with the phospholipase C (PLC) inhibitor U73122, it prevented the I_M inhibition by IMI. Also, when we dialyzed the cells with an intracellular Ca²⁺ chelator, it did not disrupt I_M inhibition by IMI, as occurs in the M₁ cascade.

4 When we incubated the cells with the generic kinase inhibitor wortmannin, it prevented the recovery of I_M from the inhibition by IMI. Also, when we applied phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) intracellularly, it diminished the inhibition of I_M by IMI.

5 Our findings suggest that PLC is the target for IMI, that recovery of I_M needs lipid phosphorylation for PIP₂ resynthesis, and that IMI inhibits I_M by activating a PLC-dependent pathway, likely by decreasing the concentration of PIP₂.

British Journal of Pharmacology (2005) **145**, 837–843. doi:10.1038/sj.bjp.0706239;

published online 25 April 2005

Keywords: Imipramine; M current; phospholipase C; phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP₂

Abbreviations: BAPTA, 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane *N,N,N,N'*-tetraacetic acid (BAPTA); DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; GDP β S, guanosine 5'-*O*-(2-thiodiphosphate); GTP, guanosine 5'-triphosphate; I_M , M current; IMI, imipramine; Oxo-M, oxotremorine methiodide; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PLC, phospholipase C; SCGs, superior cervical ganglion neurones

Introduction

It is well established that imipramine (IMI) and related tricyclic antidepressants potentiate the actions of biogenic amines by blocking their physiological inactivation, transport or reuptake, at nerve terminals (Horn *et al.*, 1971; Barbaccia *et al.*, 1983). Also, it has been shown that IMI can act on a variety of ion channels: L-type Ca²⁺ (Choi *et al.*, 1992), hEAG and Ca²⁺-sensitive potassium, SK/IK type (Gavrilova-Ruch *et al.*, 2002); voltage-gated Na⁺ (Ogata & Narahashi, 1989; Nicholson *et al.*, 2002) and voltage-gated K⁺ (Wooltorton & Mathie, 1993; Kuo, 1998; Teschemacher *et al.*, 1999; Dreixler *et al.*, 2000). Previously (Cuellar-Quintero *et al.*, 2001), we reported that IMI inhibits the M-type K⁺ current in superior cervical ganglion neurones (SCGs) and showed evidence that this effect can be attributed to intracellular actions. It has been long proposed that the K⁺ ionic current, I_M (Brown & Adams, 1980) has a relevant role in modulating neuronal excitability (Brown & Higashida, 1988; Marrion, 1997). Nevertheless, until very recently the intracellular regulation of the M channel remained mostly obscure. Recent literature supports that phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) regulates the activity of a number of transporters and channels (Hilgemann & Ball, 1996; Ford *et al.*, 2003; Loussouarn *et al.*, 2003). The current

hypothesis proposes that a reduction in PIP₂ concentration, as would occur after phospholipase C (PLC) activation (Willars *et al.*, 1998), is responsible for the agonist-induced closure of the M channel and for the inhibition of I_M (Suh & Hille, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Suh *et al.*, 2004). Despite the firmness of this hypothesis in model cells and expressed channels (KCNQ2/3), little has been shown in the native M channel, which is well documented in SCGs, and experimental evidence suggests that tricyclic antidepressants promote the activity of intracellular signaling pathways in several cellular types (Joshi *et al.*, 1999). It has been reported that the antidepressant IMI activates PLC and the formation of inositol phosphate in cultured neurones, in slices of rat frontal cortex (Shimizu *et al.*, 1993; Fukuda *et al.*, 1994), and in fish olfactory cilia reconstituted into planar lipid bilayers (Cadiou & Molle, 2003). Therefore, the purpose of our study was to assess whether intracellular actions of IMI can affect the signaling cascade that regulates I_M in SCGs.

Methods

Cell culture

SCG neurones were taken from 4- to 5-week-old male rats (Wistar) and cultured for 1 day (Beech *et al.*, 1991; Bernheim

*Author for correspondence; E-mail: erasmo@servidor.unam.mx

et al., 1991). Animals were anesthetized by CO₂ inhalation and decapitated as approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. Ganglia were dissociated and the neurones suspended twice in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated bovine serum. Cells were plated on glass coverslips coated with poly-L-lysine, incubated at 37°C (5% CO₂) overnight, and used within 24 h.

Electrophysiological recording

Patch-clamp recording of I_M was performed in the whole-cell configuration with a List EPC-7 or HEKA EPC-9 amplifier. Series resistance was 3–7 MΩ. Voltage pulse commands were generated and current records were sampled (5 kHz) and analyzed using BASIC-FASTLAB (Indec Systems, Capitola, CA, U.S.A.) and Sigma Plot (SPSS Inc.). I_M was activated by setting a holding voltage at –25 mV and deactivated by 500 ms command pulses from –25 to –60 mV every 4 s. I_M deactivation amplitude and its percentage inhibition were measured as described (Cruzblanca *et al.*, 1998; Suh & Hille, 2002). All quantitative data are expressed as the mean ± s.e.m. Comparison between two groups was analyzed using Student's unpaired *t*-test, and differences were considered significant at a level of $P < 0.05$.

To measure I_M we used solutions designed to minimize undesired currents. The pipette solution contained in (mM): 175 KCl, 5 MgCl₂, 5 HEPES, 0.1 BAPTA, 4 ATP, 0.3 GTP and 0.1 leupeptine, pH adjusted to 7.4 with KOH. The external solution contained in (mM): 160 NaCl, 2.5 KCl, 5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 8 Glucose and 0.0002 TTX, pH adjusted to 7.4 with NaOH. IMI was applied by using a focal perfusion system (Automate Scientific, Inc., San Francisco, CA, U.S.A.), which locally exchanges the external solution within 1 s. IMI treatment was for 40–60 s allowing to attain its maximal effect. All experiments were performed at room temperature (23–25°C).

Reagents

IMI and Oxotremorine (RBI, Natick, MA, U.S.A.), GDPβS (SIGMA, St Louis, MO, U.S.A.), Bradykinin (Peninsula Laboratories, Belmont, CA, U.S.A.), BAPTA (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.), U73122, U73343, wortmannin and PIP₂ (*α*-phosphatidyl-D-*myo*-inositol-4,5-bisphosphate, triammonium salt from bovine brain) (Calbiochem, La Jolla, CA, U.S.A.). U73122 and U73343 were dissolved in chloroform to a final concentration of 5 mM and aliquoted into Eppendorf tubes. After evaporation of the solvent under N₂, tubes were stored at 4°C. On the day of experiment, one aliquot was dissolved in dimethyl sulfoxide to a concentration of 2.5 mM. PIP₂ was dissolved in chloroform, and aliquots were dissolved at –20°C under N₂. On the day of the experiment, the chloroform was evaporated with a stream of N₂ to leave a filmy residue of PIP₂. Recording solution was mixed with this residue for ~10 min before sonication on ice until the solution was clear (~30 min).

Results

IMI inhibits I_M without G protein activation

Several neurotransmitters affect the excitability of neurones through receptors coupled to G proteins and intracellular

messengers (Wanke *et al.*, 1987; Bernheim *et al.*, 1991; Shapiro *et al.*, 1994). It is known that the inhibition by the muscarinic agonist Oxo-M, an M₁ pathway activator (Caulfield *et al.*, 1994) is mediated by a G protein non-PTX-sensitive Gα_q (Haley *et al.*, 2000). Furthermore, it has been long demonstrated that Oxo-M inhibits I_M (Hille, 1994). Thus, we used Oxo-M to evaluate G protein mediated responses. To assess whether IMI acts *via* a G-protein-linked mechanism, its effect was evaluated in neurones dialyzed for 10 min with the G protein signaling blocker GDPβS and the muscarinic inhibition was used as a positive control. Both Oxo-M and IMI readily evoked inhibition on I_M as expected for control conditions. This result is depicted in Figure 1a. It shows the effect of 10 μM Oxo-M and 10 μM IMI on the amplitude of I_M when the cells were internally dialyzed with the control solution containing GTP (0.3 mM). Figure 1b shows superimposed I_M traces representative of Figure 1a in the absence (1) or presence of Oxo-M (2) and IMI (3). On the other hand, GDPβS disrupted Oxo-M inhibition, whereas neither the extent nor the kinetics of I_M inhibition by IMI was changed, as shown in Figure 1c. It shows the effect of 10 μM Oxo-M and 10 μM IMI on the amplitude of I_M when cells were dialyzed

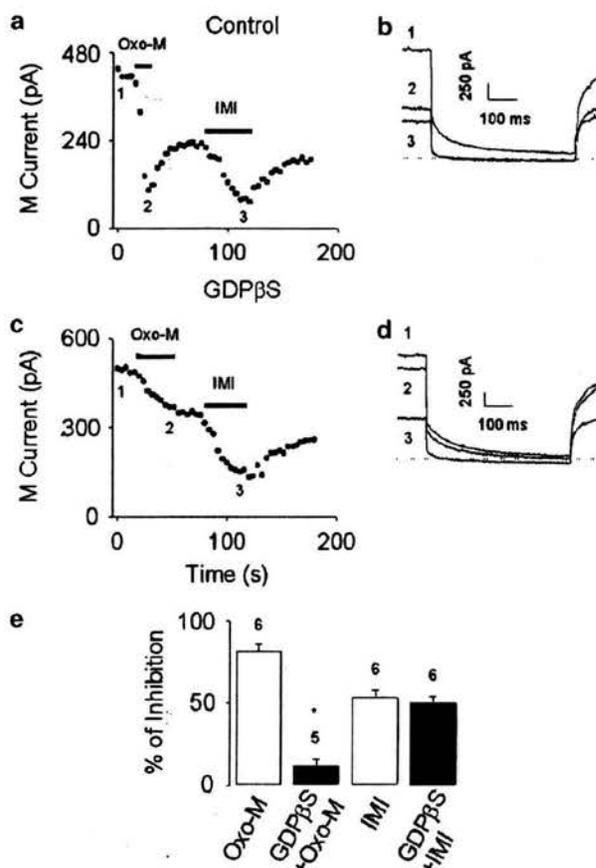


Figure 1 IMI response on I_M in the presence of GDPβS. Inhibition of I_M by 10 μM Oxo-M and 10 μM IMI in the absence (a) and the presence (c) of GDPβS (3 mM) in the patch pipette. (b, d) Current traces representative of (a, c) respectively, before (b1, d1) and during application of Oxo-M (b2, d2) or IMI (b3, d3). (e) Summary of experiments. Data plotted as mean ± s.e.m. The numbers above columns indicate the number of tested cells. *Indicates $P < 0.05$; *t*-test vs control.

with an internal solution containing GDP β S (3 mM). Figure 1d shows superimposed I_M traces representative of Figure 1c in the absence (1) or presence of Oxo-M (2) and IMI (3). Aggregated data of the above experiments are shown in Figure 1e, which confirm the difference in G protein dependence between Oxo-M and IMI. Inhibition of I_M by Oxo-M and IMI with the control internal solution was 81.7 ± 4 ($n=6$) and 53.7 ± 4 ($n=6$), respectively. Consistently, the inhibition of I_M by Oxo-M and IMI in GDP β S conditions was 12.4 ± 4 ($n=5$) and 50.3 ± 3 , respectively ($n=6$). Thus, these results indicate that G proteins do not underlie the effect of IMI on I_M and open the possibility that it affects PLC as it occurs in other preparations (Fukuda *et al.*, 1994; Cadiou & Molle, 2003). Therefore, the intracellular target for IMI should be expected beyond the G protein activation step, possibly at PLC level.

IMI requires PLC activation to inhibit I_M

Current data show that IMI reversibly reduces I_M without a shift in voltage-dependence or kinetics in SCGs (Cuellar-Quintero *et al.*, 2001) and stimulates PLC activity *in vitro* (Fukuda *et al.*, 1994) with formation of IP₃ in rat frontal cortex (Shimizu *et al.*, 1993). These effects are similar to those obtained by muscarinic agonists (Suh & Hille, 2002) and the neuropeptide BK (Jones *et al.*, 1995; Haley *et al.*, 2000). The above results indicate that IMI may affect a specific signaling pathway that involves depletion of PLC substrates. To test whether activation of PLC is required for suppression of I_M , we compared the effect of a PLC inhibitor U73122 with that of its inactive analog U73343. As a positive control we used BK, which is known to require the activation of PLC to reduce I_M (Jones *et al.*, 1995; Cruzblanca *et al.*, 1998; Haley *et al.*, 2000). Figure 2 shows results obtained in SCG neurones incubated with U73343 (10 μ M) (Figure 2a and b) or U73122 (10 μ M) (Figure 2c) for 5 min. We found that the inhibition of I_M by 100 nM BK in cells treated with the inactive analog was of $38.1 \pm 7\%$ ($n=5$) (Figure 2a). This inhibition was reduced significantly ($P < 0.05$) in cells treated with the PLC inhibitor ($2.7 \pm 2\%$, $n=10$) (Figure 2c). In the same way we found that inhibition of I_M by 10 μ M IMI in control cells was $58.1 \pm 2\%$ ($n=9$) and in cells treated with the inactive analog was of $54.1 \pm 6\%$ ($n=10$; Figure 2b). This inhibition is significantly ($P < 0.05$) smaller in cells treated with the PLC inhibitor ($14.2 \pm 4\%$, $n=8$; Figure 2c). Summary data of these experiments are illustrative (Figure 2d). Figure 2e–g shows superimposed I_M traces representative of Figure 2a–c, respectively. These results led us to propose that I_M inhibition by IMI can be attributed to PLC activation (see Figure 2d).

BK, a B₂ pathway activator (Jones *et al.*, 1995), has been shown to inhibit I_M by a well-documented slow mechanism mediated by a Ca²⁺-calmodulin system, depending on Ca²⁺ release from IP₃-sensitive stores (Cruzblanca *et al.*, 1998). In order to test whether IMI inhibits I_M by a Ca²⁺-sensitive pathway as BK does, we dialyzed neurones for 9 min with the intracellular Ca²⁺ chelator BAPTA, and used BK as a positive control. As expected, the inhibition of I_M by 50 nM BK was $43.1 \pm 2\%$ ($n=8$, Figure 3a and d) with 0.1 mM BAPTA and only $7.8 \pm 3\%$ ($n=11$) with 20 mM BAPTA (Figure 3c and d). Figure 3b shows that 50 μ M IMI strongly suppresses I_M in a cell dialyzed with the standard internal solution containing 0.1 mM BAPTA. I_M inhibition using this standard internal

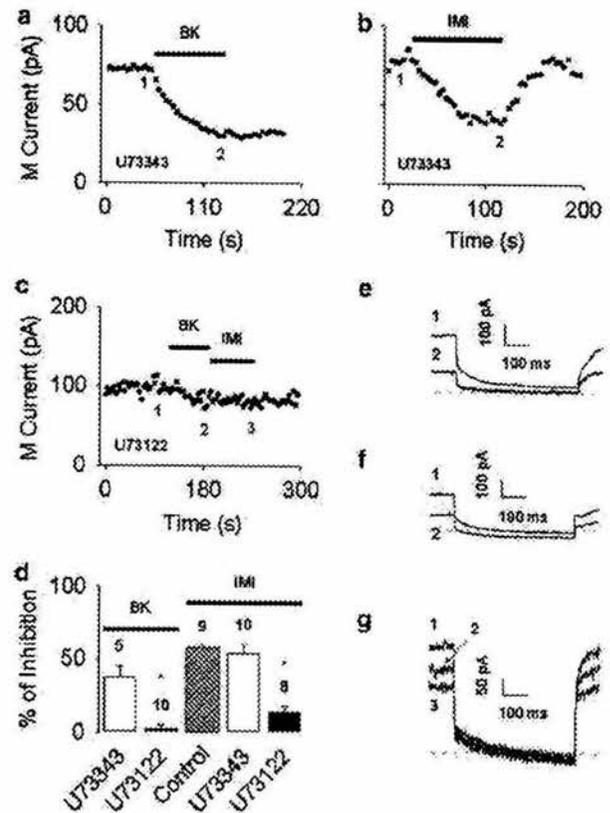


Figure 2 Effect of IMI on I_M in the presence of U73122. SCG neurones were incubated during 5 min with U73122 (10 μ M) or its inactive analog U73343 (10 μ M). (a, b) Effect of U73343 on the amplitude of I_M in the presence of 100 nM BK (a) or 10 μ M IMI (b). Current traces representative of (a, b), respectively, before (e1, f1) and during application of BK (e2) or IMI (f2). (c) Effect of U73122 on the amplitude of I_M in the presence of 100 nM BK and 10 μ M IMI. Current traces representative of (c) before (g1) and during application of BK (g2) or IMI (g3). (d) Summary of experiments. Data plotted as mean \pm s.e.m. The numbers above columns indicate the number of tested cells. *Indicates $P < 0.05$; *t*-test vs control.

solution was $78.1 \pm 2\%$ ($n=8$; Figure 1d). Similarly, with a pipette solution containing 20 mM BAPTA, the inhibition was $75.8 \pm 5\%$ ($n=7$) (Figure 1c and d). This results argues against a Ca²⁺-dependence for IMI response on I_M . Nevertheless, although both Oxo-M and BK have been shown to inhibit I_M by activating a PLC, support has been provided to suggest different pathways being activated. M₁ stimulates PLC β ₁ (Berstein *et al.*, 1992; Dippel *et al.*, 1996) while B₂ stimulates PLC β ₄ (Haley *et al.*, 2000). Furthermore, muscarinic agonists do not alter intracellular Ca²⁺ concentration at all in sympathetic neurones (Beech *et al.*, 1991). Taking into account, the above results which show that IMI activates a PLC to inhibit I_M in a manner not sensitive to BAPTA lead us to compare the effect of Oxo-M and IMI in the presence of the aminosteroids U73343 and U73122. Figure 4 shows results obtained in SCG neurones incubated with U73343 (10 μ M) (Figure 4a and b) or U73122 (10 μ M) (Figure 4c) for 5 min. We found that the inhibition of I_M by 10 μ M Oxo-M in cells treated with the inactive analog was of $82.9 \pm 4\%$ ($n=5$) (Figure 4a). This inhibition was reduced significantly ($P < 0.05$) in cells treated with the PLC inhibitor ($6.7 \pm 3\%$, $n=5$) (Figure 4c). In the same way we found that inhibition of I_M by 10 μ M IMI in

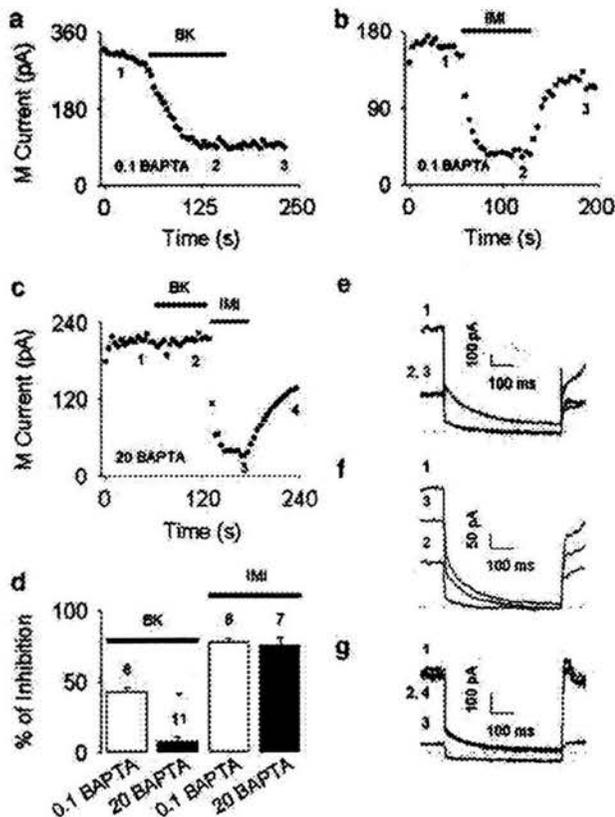


Figure 3 IMI response on I_M in the presence of high BAPTA. Inhibition of I_M by 50 nM BK or 10 μ M IMI in the presence of 0.1 mM (a, b) or 20 mM (c) BAPTA in the patch pipette. (e–g) Current traces representative of (a–c), respectively, before (e1, f1, g1), during application of BK (e2, g2) or IMI (f2, g3) and during washout (e3, f3, g4). (d) Summary of experiments. Data plotted as mean \pm s.e.m. The numbers above columns indicate the number of tested cells. *Indicates $P < 0.05$; t -test vs control.

control cells was of $50.8 \pm 7\%$ ($n = 4$) and in cells treated with the inactive analog was of $47 \pm 4\%$ ($n = 5$; Figure 4b). This inhibition is significantly ($P < 0.05$) smaller in cells treated with the PLC inhibitor ($7.3 \pm 3\%$, $n = 5$; Figure 4c). Summary data of these experiments are illustrative (Figure 4d). Figure 4e–g shows superimposed I_M traces representative of Figure 4a–c, respectively. These results led us to propose that I_M inhibition by IMI can be attributed to PLC activation (see Figure 2d) likely using the M₁ pathway.

Intracellular application of PIP₂ prevents I_M inhibition by IMI

It has been proposed that a reduction in PIP₂ concentration, as would occur after PLC activation (Willars *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1999), could be responsible for agonist-induced closure of M channel (Suh & Hille, 2002; Zhang *et al.*, 2003). In such a way, it has been shown that blockade of recycling agonist-sensitive pools of PIP₂ prevents the recovery of I_M from muscarinic inhibition (Suh & Hille, 2002). This antecedent along with the above results (see Figure 4) prompted us to ask if the inhibition of I_M by IMI was irreversible when blocking PIP₂ resynthesis by lipid kinase inhibitors. To address this question we applied in the bath, the kinase inhibitor

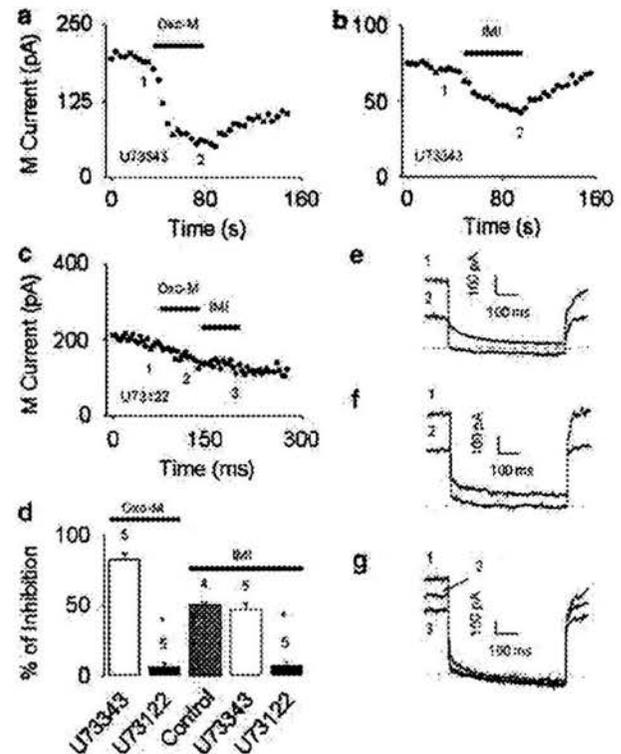


Figure 4 Effect of IMI response on I_M in the presence of U73122. SCG neurons were incubated during 5 min with U73122 (10 μ M) or its inactive analog U73343 (10 μ M). (a, b) Effect of U73343 on the amplitude of I_M in the presence of 10 μ M Oxo-M (a) or 10 μ M IMI (b). Current traces representative of (a, b), respectively, before (e1, f1) and during application of Oxo-M (e2) or IMI (f2). (c) Effect of U73122 on the amplitude of I_M in the presence of 10 μ M Oxo-M or 10 μ M IMI. Current traces representative of (c) before (g1) and during application of Oxo-M (g2) or IMI (g3). (d) Summary of experiments. Data plotted as mean \pm s.e.m. The numbers above columns indicate the number of tested cells. *Indicates $P < 0.05$; t -test vs control.

wortmannin (Nakanishi *et al.*, 1995) and used the muscarinic inhibition as a positive control. As expected, the recovery of I_M from inhibition by Oxo-M in control conditions was $82 \pm 9\%$ ($n = 3$; Figure 5a), whereas only $32.5 \pm 5\%$ ($n = 4$) was recovered 5 min after wortmannin (10 μ M) treatment began and the recovery was slowed (Figure 5a). In order to discard effects due to desensitization in successive application of Oxo-M, this experiment was repeated in independent cells with the same result ($n = 4$). Furthermore, this positive control with wortmannin has been extensively documented (Suh & Hille, 2002). Interestingly, the recovery of I_M from inhibition by IMI in control conditions was of $96 \pm 2\%$ ($n = 5$; Figure 5b) whereas just $50 \pm 0.3\%$ ($n = 5$) 5 min after wortmannin (10 μ M, Figure 5b) treatment began. Cumulative data support this finding (Figure 5c). In Figure 5d and e, superimposed I_M traces representative of Figure 5a and b respectively are shown. These results support the hypothesis that recovery of I_M from inhibition by IMI requires recycling of agonist-sensitive pools of PIP₂.

Finally, in order to demonstrate the participation of PIP₂ on the response induced by IMI on I_M , we dialyzed SCG cells for 5 min with PIP₂ (182 μ M) via the patch pipette and muscarinic inhibition was used as a positive control. Current evidence

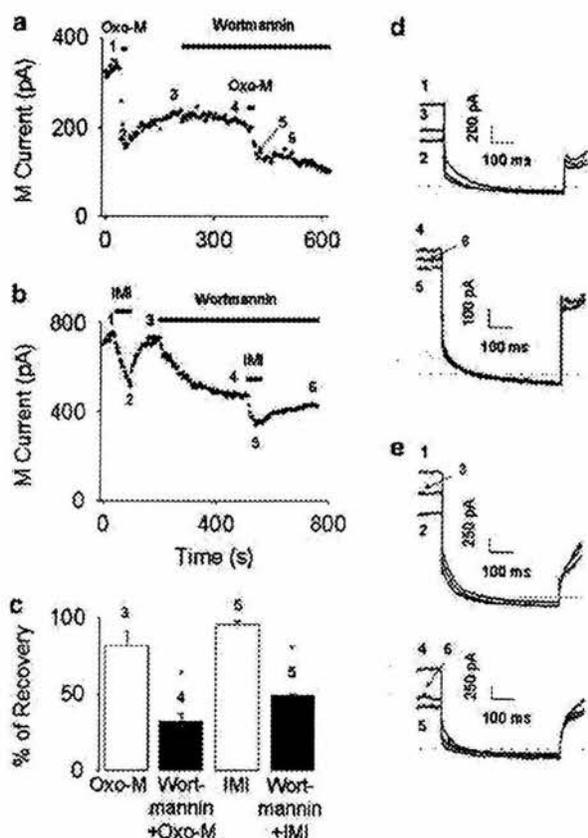


Figure 5 Recovery of I_M from inhibition by IMI in the presence of Wortmannin. (a) Inhibition and recovery of I_M by 10 μ M Oxo-M in control conditions and under treatment with Wortmannin (10 μ M). (b) Superimposed I_M traces of (a) before (d1, d2, d3) or under treatment with Wortmannin (d4, d5, d6); during control conditions (d1, d4), in the presence of Oxo-M (d2, d5) and after washout (d3, d6). (c) Inhibition and recovery of I_M by 10 μ M IMI in control conditions and under treatment with Wortmannin (10 μ M). (e) Superimposed I_M traces of (b), before (e1, e2, e3) or under treatment with Wortmannin (e4, e5, e6) during control conditions (e1, e4), in the presence of IMI (e2, e5) and after washout (e3, e6). (c) Summary of experiments. Data plotted as mean \pm s.e.m. The numbers above columns indicate the number of tested cells. *Indicates $P < 0.05$; t -test vs control.

demonstrating the effect of PIP₂ on K⁺ channels has been obtained from expressed channels (Xie *et al.*, 1999; Loussouarn *et al.*, 2003). A direct interaction between an identified histidine residue in the C terminus proximal to the cytosolic end of the last transmembrane domain (S6) of the KCNQ channel and PIP₂ is proposed by Zhang *et al.*, 2003. Mutations of this histidine residue significantly decrease the sensitivity of the channel to PIP₂ resulting in functionally silent channels. Thus, if PIP₂ hydrolysis underlies the effect induced by IMI on I_M , intracellular restoration of this phospholipid *via* the patch pipette would be expected to prevent or diminish the IMI effect. In cells dialyzed with the control internal solution, we found that the percent of inhibition of I_M by 10 μ M Oxo-M (Figure 6a) was 80.1 \pm 3%; $n = 13$. In the presence of PIP₂, this inhibition was reduced significantly ($P < 0.05$; 9.6 \pm 2%; $n = 10$) (Figure 6b). Notably, a similar result was found for IMI inhibition. In control cells, 10 μ M IMI inhibited I_M by 56.6 \pm 2% ($n = 11$; Figure 6a) whereas in the presence of PIP₂ only 20.1 \pm 2% ($n = 13$; Figure 6b). Summary data of these

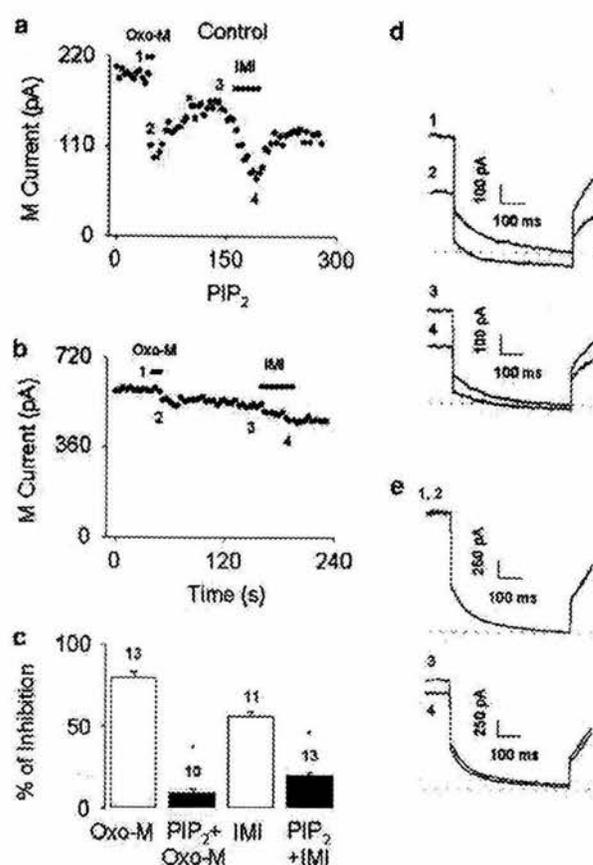


Figure 6 Effect of IMI on I_M under intracellular application of PIP₂. Inhibition of I_M by 10 μ M Oxo-M and 10 μ M IMI in the absence (a) and the presence (b) of PIP₂ (182 μ M) in the patch pipette. (d, e) Superimposed I_M traces of (a, b) in the absence (d1, d3, e1, e3) or the presence of Oxo-M (d2, e2) and IMI (d4, e4). (c) Summary of experiments. Data plotted as mean \pm s.e.m. The numbers above columns indicate the number of tested cells. *Indicates $P < 0.05$; t -test vs control.

experiments (Figure 6c) are illustrative and consistent with the above observations. In Figure 6d and e, some superimposed I_M traces representative of Figure 6a and b, respectively, are shown. This result supports our proposition that a decrease in PIP₂ concentration underlies the I_M inhibition by IMI.

Discussion

In a previous report (Cuellar-Quintero *et al.*, 2001), we describe that IMI reversibly reduces I_M while voltage dependence or kinetics remains unchanged. Furthermore, we documented that IMI can access the intracellular side when applied either in the bath or in the pipette. In addition, we showed evidence that the neutral form of IMI applied extracellularly enhances its effectiveness in reducing I_M , likely by facilitating the passage of IMI across the membrane. These results prompted us to ask whether IMI might act on an internal substrate involved in the receptor-mediated inhibition of I_M . Here we show for the first time in a native system (SCGs) that, (1) a PLC inhibitor (U73122) prevents I_M from the inhibition by IMI, (2) a generic phosphatidylinositol kinases inhibitor (wortmannin) prevents the recovery of I_M

from inhibition by IMI, as some kinases are needed likely for PIP₂ resynthesis, and (3) internal dialysis of the cell with PIP₂ disrupts the *I*_M inhibition by IMI.

IMI targets PLC to inhibit *I*_M

To date it is widely accepted that the M-channel is linked to a G protein coupled receptor (Suh & Hille, 2002). Therefore, we asked whether IMI could inhibit *I*_M by G protein activation. Figure 1 shows that dialysis with the competitive inhibitor GDPβS does not alter the induced-inhibition of *I*_M by IMI. This indicates that IMI does not act on the G protein or the receptor, rather that its substrate is located downstream of the regulatory pathway. Accordingly, Fukuda *et al.* (1994) found that IMI directly activates PLCβ in cultured neurones of rat frontal cortex. This result prompted us to ask whether IMI is able to activate PLC also in SCGs. Figures 2c and 4c show that the PLC inhibitor U73122 prevents *I*_M inhibition by IMI. This finding is consistent with the hypothesis that IMI stimulates PLC activity to inhibit *I*_M. Thus, it is tempting to speculate whether this drug might exert its action through an already known G protein-coupled receptor pathway. It has long been proposed that the M channel is linked to membrane receptors through signaling cascades involving G proteins and second messengers (Hille, 1994). Presently, it is well known that muscarinic M₁ and Bradykinin B₂ receptors both couple to a heterotrimeric G protein, G_{q/11} (Haley *et al.*, 2000) and exert modulatory influences on the M channel. Furthermore, it is documented that each cascade stimulates a different PLCβ, PLCβ₁ (Berstein *et al.*, 1992; Dippel *et al.*, 1996) or PLCβ₄ (Haley *et al.*, 2000). Thus, the initial claim by Fukuda *et al.* (1994) that IMI directly activates PLCβ₁ without receptor or G protein mediation in cultured neurones of rat frontal cortex, is supported by our results. There is some concern that IMI might promote intracellular actions by Ca²⁺ rise from internal stores, likely IP₃-activated. The B₂ pathway may be a possible target for IMI because it is part of the Ca²⁺-dependent signaling cascade. However, unlike BK, no Ca²⁺-dependence for IMI response on *I*_M was observed (Figure 3). Otherwise, muscarinic agonists do not alter intracellular Ca²⁺ concentration at all in sympathetic neurones (Beech *et al.*, 1991), and IP₃ produced by M₁ receptor-induced hydrolysis of PIP₂ has not been shown to have any consequence concerning *I*_M regulation. Therefore, the muscarinic M₁ cascade seems, with data presently available, the likely signaling pathway being altered by IMI in *I*_M regulation. Further experiments to confirm this proposition are beyond the scope of this work.

PIP₂ hydrolysis underlies the effect induced by IMI on *I*_M

To date, PIP₂ is the strongest candidate being investigated to modulate the M channel. This hypothesis implies that an agonist-induced reduction in PIP₂ concentration may be responsible for M-channel closure (Suh & Hille, 2002; Zhang

et al., 2003). Therefore, we wanted to test whether PIP₂ resynthesis inhibitors and analogs might alter the IMI response on *I*_M. Figure 5b shows that wortmannin prevents and slows *I*_M recovery from inhibition by IMI, indicating that a PI-kinase is required for *I*_M recovery. It is also known that wortmannin is an inhibitor of PI 3- and PI 4-kinases, as well as of the light chain kinase (Nakanishi *et al.*, 1995). In addition, there is supporting evidence that the PI4-kinase is the enzyme required for recovery of *I*_M from muscarinic inhibition, particularly for lipid phosphorylation and PIP₂ resynthesis (Suh & Hille, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Our observation reinforces the proposition that IMI stimulates PLC, which in turn induces PIP₂ hydrolysis. It seems that continuous PIP₂ resynthesis is required for recovery of *I*_M from the inhibition by IMI, in a similar way as it has been proposed to occur for the M₁ muscarinic pathway. Therefore, our thinking was that an experimentally induced PIP₂ elevation might prevent changes elicited by IMI on the *I*_M. Dialyzing of the SCG cells with PIP₂ analogs made this experiment possible. Figure 6b confirms that internal loading of the cell with PIP₂ disrupts *I*_M inhibition by IMI. These results are consistent with the hypothesis that the amplitude of the KCNQ2/KCNQ3 current mirrors the PIP₂ level in the membrane (Suh & Hille, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Therefore, PIP₂ acts as a membrane-diffusible second messenger to regulate directly the activity of KCNQ currents (Zhang *et al.*, 2003). Indeed, PIP₂ is thought to be a direct modulator of *I*_M activity and its hydrolysis cause current inhibition.

Finally, it is also interesting to contrast our results with what has been reported in other preparations. There is evidence (Wooltorton & Mathie, 1993; Kuo, 1998; Weinschenker *et al.*, 1999; Terstappen *et al.*, 2001) that IMI directly interacts with native and cloned K⁺ channels. For example, it has been reported (Kuo, 1998) that IMI is an external open A-type K⁺ current (*I*_A) channel blocker in rat hippocampal neurones. Also, strong evidence has been shown recently (Garcia-Ferreiro *et al.*, 2004) that IMI blocks the ether a go-go voltage-gated K⁺ channel from the intracellular side of the membrane by binding in its charged form to a site located close to the inner end of the selectivity filter.

Taking together the present results, whatever the mechanism turns out to be, we show for the first time in a native system evidence that the tricyclic antidepressant IMI activates a route that involves PLC and PIP₂ in regulating *I*_M. Future design of drugs with specific action on PLC-β1 and the M-channel should be a powerful tool in modulating neuronal excitability.

This work was supported by DGAPA-UNAM IN219302, IN207204, IN207405 and CONACyT P41489-M grants, and The Alexander von Humboldt Stiftung, Germany. We thank PDCB-UNAM, México, Manuel Hernández, Guillermo Luna and Rogelio Hernández for technical help. Ing. Gustavo Díaz and Amado García for software support and electronics. Lea M. Miller for improving the manuscript. Dr Enrique Pinzón for excellent care of rats.

References

- BARBACCIA, M.L., GANDOLFI, O., CHUANG, D.M. & COSTA, E. (1983). Modulation of neuronal serotonin uptake by a putative endogenous ligand of imipramine recognition sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 5134–5138.
- BEECH, D.J., BERNHEIM, L., MATHIE, A. & HILLE, B. (1991). Intracellular Ca²⁺ buffers disrupt muscarinic suppression of Ca²⁺ current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 652–656.

- BERNHEIM, L., BEECH, D.J. & HILLE, B. (1991). A diffusible second messenger mediates one of the pathways coupling receptors to calcium channels in rat sympathetic neurons. *Neuron*, **6**, 859–867.
- BERSTEIN, G., BLANK, J.L., SMRCKA, A.V., HIGASHIJIMA, T., STERNWEIS, P.C., EXTON, J.H. & ROSS, E.M. (1992). Reconstitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis using purified m1 muscarinic receptor, G_{q/11}, and phospholipase C-β₁. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8081–8088.
- BROWN, D.A. & ADAMS, P.R. (1980). Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature*, **283**, 673–676.
- BROWN, D.A. & HIGASHIDA, H. (1988). Voltage- and calcium-activated potassium currents in mouse neuroblastoma × rat glioma hybrid cells. *J. Physiol.*, **397**, 149–165.
- CADIOU, H. & MOLLE, G. (2003). Adenophostin A and imipramine are two activators of the olfactory inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channel in fish olfactory cilia. *Eur. Biophys. J.*, **32**, 106–112.
- CAULFIELD, M.P., JONES, S., VALLIS, Y., BUCKLEY, N.J., KIM, G.D., MILLIGAN, G. & BROWN, D.A. (1994). Muscarinic M-current inhibition via G_{q/11} and α-adrenoceptor inhibition of Ca²⁺ current via G_o in rat sympathetic neurones. *J. Physiol.*, **477**, 415–422.
- CHOI, J.J., HUANG, G.J., SHAFIK, E., WU, W.H. & MCARDLE, J.J. (1992). Imipramine's selective suppression of an L-type calcium channel in neurons of murine dorsal root ganglia involves G proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **263**, 49–53.
- CRUZBLANCA, H., KOH, D.S. & HILLE, B. (1998). Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca²⁺ release from IP₃-sensitive Ca²⁺ stores in rat sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 7151–7156.
- CUELLAR-QUINTERO, J.L., GARCÍA, D.E. & CRUZBLANCA, H. (2001). The antidepressant imipramine inhibits the M-type K⁺ current in rat sympathetic neurons. *Neuroreport*, **12**, 2195–2198.
- DIPPEL, E., KALKBRENNER, F., WITTIG, B. & SCHULTZ, G. (1996). A heterotrimeric G protein complex couples the muscarinic m1 receptor to phospholipase C-β. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 1391–1396.
- DREIXLER, J.C., BIAN, J., CAO, Y., ROBERTS, M.T., ROIZEN, J.D. & HOUAMED, K.M. (2000). Block of rat brain recombinant SK channels by tricyclic antidepressants and related compounds. *Eur. J. Pharmacol.*, **28**, 1–7.
- FORD, C.P., STEMKOWSKI, P.L., LIGHT, P.E. & SMITH, P.A. (2003). Experiments to test the role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in neurotransmitter-induced M-channel closure in bullfrog sympathetic neurons. *J. Neurosci.*, **23**, 4931–4941.
- FUKUDA, H., NISHIDA, A., SAITO, H., SHIMIZU, M. & YAMAWAKI, S. (1994). Imipramine stimulates phospholipase C activity in rat brain. *Neurochem. Int.*, **25**, 567–571.
- GARCÍA-FERREIRO, R.E., KERSCHENSTEINER, D., MAJOR, F., MONJE, F., STÜHMER, W. & PARDO, L.A. (2004). Mechanism of block of hEag1 K⁺ channels by Imipramine and Astemizole. *J. Gen. Physiol.*, **124**, 301–317.
- GAVRILOVA-RUCH, O., SCHONHERR, K., GESSNER, G., SCHONHERR, R., KLAPPERSTUCK, T., WOHLRAB, W. & HEINEMANN, S.H. (2002). Effects of imipramine on ion channels and proliferation of IGR1 melanoma cells. *J. Membr. Biol.*, **188**, 137–149.
- HALEY, J.E., ABOGADIE, J.M., FERNANDEZ-FERNANDEZ, J.M., DAYRELL, M., VALLIS, Y., BUCKLEY, N.J. & BROWN, D. (2000). Bradykinin, but not muscarinic, inhibition of M-current in rat sympathetic ganglion neurons involves phospholipase C-β₄. *J. Neurosci.*, **20**, 3–5.
- HILGEMANN, D.W. & BALL, R. (1996). Regulation of cardiac Na⁺, Ca²⁺ exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP₂. *Science*, **273**, 956–959.
- HILLE, B. (1994). Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.*, **17**, 531–536. Review.
- HORN, A.S., COYLE, J.T. & SNYDER, S.H. (1971). Catecholamine uptake by synaptosomes from rat brain. Structure–activity relationships of drugs with differential effects on dopamine and norepinephrine neurons. *Mol. Pharmacol.*, **7**, 66–80.
- JONES, S., BROWN, D.A., MILLIGAN, G., WILLER, E., BUCKLEY, N.J. & CAULFIELD, M.J. (1995). Bradykinin excites rat sympathetic neurons by inhibition of M current through a mechanism involving B₂ receptors and G_{q/11}. *Neuron*, **14**, 399–405.
- JOSHI, G.P., SINGH, A. & RAVICHANDRA, B. (1999). High concentration of tricyclic antidepressants increase intracellular Ca²⁺ in cultured neural cells. *Neurochem. Res.*, **24**, 391–398.
- KUO, C.C. (1998). Imipramine inhibition of transient K⁺ current: an external open channel blocker preventing fast inactivation. *Biophys. J.*, **75**, 2845–2857.
- LOUSSOUARN, G., PARK, K.H., BELLOCQ, C., BARO, I., CHARPENTIER, F. & ESCANDE, D. (2003). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *EMBO J.*, **22**, 5412–5421.
- MARRION, N.V. (1997). Control of M-current. *Annu. Rev. Physiol.*, **59**, 483–504.
- NAKANISHI, S., CATT, K.J. & BALLA, T. (1995). A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 5317–5321.
- NICHOLSON, G.M., BLANCHE, T., MANSFIELD, K. & TRAN, Y. (2002). Differential blockade of neuronal voltage-gated Na⁺ and K⁺ channels by antidepressant drugs. *Eur. J. Pharmacol.*, **452**, 35–48.
- OGATA, N. & NARAHASHI, T. (1989). Block of sodium channels by psychotropic drugs in single guinea-pig cardiac myocytes. *Br. J. Pharmacol.*, **97**, 905–913.
- SHAPIRO, M.S., WOLLMUTH, L.P. & HILLE, B. (1994). Angiotensin II inhibits calcium and M current channels in rat sympathetic neurons via G proteins. *Neuron*, **12**, 1319–1329.
- SHIMIZU, M., NISHIDA, A. & YAMAWAKI, S. (1993). Antidepressants inhibit spontaneous oscillations of intracellular Ca²⁺ concentration in rat cortical cultured neurons. *Neurosci. Lett.*, **146**, 101–104.
- SUH, B.C. & HILLE, B. (2002). Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron*, **35**, 507–520.
- SUH, B.C., HOROWITZ, L.F., HIRDES, W., MACKIE, K. & HILLE, B. (2004). Regulation of KCNQ2/KCNQ3 current by G protein cycling: the kinetics of receptor-mediated signaling by G_q. *J. Gen. Physiol.*, **123**, 663–683.
- TERSTAPPEN, G.C., PULA, G., CARIGNANI, C., CHEN, M.X. & RONCARATI, R. (2001). Pharmacological characterization of the human small conductance calcium-activated potassium channel hSK3 reveals sensitivity to tricyclic antidepressants and anti-psychotic phenothiazines. *Neuropharmacology*, **40**, 772–783.
- TESCHEMACHER, A.G., SEWARD, E.P., HANCOX, J.C. & WITCHEL, H.J. (1999). Inhibition of the current of heterologously expressed HERG potassium channels by imipramine and amitriptyline. *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 479–485.
- WANKE, E., FERRONI, A., MALGAROLI, A., AMBROSINI, A., POZZAN, T. & MELDOLESI, J. (1987). Activation of a muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca²⁺ current in rat sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 4313–4317.
- WEINSHENKER, D., WEI, A., SALKOFF, L. & THOMAS, J.H. (1999). Block of an ether-a-go-go-like K⁺ channel by imipramine rescues egl-2 excitation defects in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.*, **19**, 9831–9840.
- WILLARS, G.B., NAHORSKI, S.R. & CHALLISS, R.A. (1998). Differential regulation of muscarinic acetylcholine receptor-sensitive polyphosphoinositide pools and consequences for signaling in human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5037–5046.
- WOOLTORTON, J.R. & MATHIE, A. (1993). Block of potassium currents in rat isolated sympathetic neurones by tricyclic antidepressants and structurally related compounds. *Br. J. Pharmacol.*, **110**, 1126–1132.
- XIE, L.H., HORIE, M. & TAKANO, M. (1999). Phospholipase C-linked receptors regulate the ATP-sensitive potassium channel by means of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 15292–15297.
- ZHANG, H., CRACIUN, L.C., MIRSHAHI, T., ROHÁCS, T., LOPES, C.M.B., JIN, T. & LOGOTHETIS, D.E. (2003). PIP₂ activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron*, **37**, 963–975.

(Received February 7, 2005)

Revised March 11, 2005

Accepted March 11, 2005

Published online 25 April 2005)

The antidepressant imipramine inhibits the M-type K^+ current in rat sympathetic neurons

Jania L. Cuellar-Quintero, David E. García and Humberto Cruzblanca^{1,CA}

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM A.P. 70250, México, D.F., C.P. 04510; ¹Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Colima, A.P. 199, Ave. 25 de Julio 945, Col. Villas San Sebastian, Colima, Col., C.P. 28045, México

^{CA}Corresponding Author

Received 25 April 2001; accepted 9 May 2001

This study aimed to assess the effects of the antidepressant drug imipramine (IMI) on the neuronal M-type K^+ current ($I_{K(M)}$). We show that IMI reversibly reduces $I_{K(M)}$ with an IC_{50} of 7 μ M. The $V_{0.5}$ and slope factor of the steady state activation curve remained unchanged after IMI, indicating a mode of action that is voltage insensitive for blocking the M-channel. Patch pipette application of IMI elicits same inhibitory response

suggesting a binding site on the M-channel accessible from both sides of the cell membrane. Accordingly, the inhibitory effect of IMI is larger by rising external pH near to the pK_a of the drug. Therefore, we propose that a neutral form of IMI binds more efficiently to M-channels to exert its inhibitory action by a voltage-independent mechanism. *NeuroReport* 12:2195–2198 © 2001 Lippincott Williams & Wilkins.

Key words: Antidepressant drugs; Imipramine; M-current regulation; Neurons; Potassium channels

INTRODUCTION

The M-current ($I_{K(M)}$) is a voltage-dependent, slowly activating and non-inactivating K^+ current strongly inhibited by muscarinic receptors in peripheral and central neurons [1]. M-channels open near to the threshold of neuronal firing, therefore sustained activation of $I_{K(M)}$ reduces neuronal excitability as it does during the adaptive behavior of spike frequency [2]. In contrast, receptor-mediated inhibition of $I_{K(M)}$ generates a slow excitatory postsynaptic potential that may induce high frequency repetitive firing. Moreover $I_{K(M)}$ inhibition increases cell input resistance, thereby making other concomitant excitatory inputs more likely to fire the neuron [1]. Besides muscarinic agonists, peptides including bradykinin, angiotensin II and substance P inhibit $I_{K(M)}$ by activating their specific G-protein coupled receptors [3–5]. Thus, neurotransmitters or therapeutic drugs suppressing $I_{K(M)}$ might have profound effects on neuronal excitability.

The antidepressant drug imipramine and related compounds are frequently used for the treatment of depressive disorders. Although it is commonly accepted that their therapeutic actions may involve the blockade of the serotonin (5-HT) and noradrenaline reuptake, other acute effects of antidepressant drugs have been reported including stimulation of phospholipase C [6] and glutamate release [7] and inhibition of native K^+ currents or cloned K^+ channels [8–10]. These K^+ currents are mostly involved in action potential spiking, rather than in modulating synaptic efficacy and/or firing frequency, as $I_{K(M)}$ does. Therefore

the aim of this study was to test whether therapeutic concentrations of imipramine reduce $I_{K(M)}$ in rat sympathetic neurons.

MATERIALS AND METHODS

Preparation: Experiments were performed on 1-day cultured superior cervical ganglion (SCG) neurons from 5- to 6-week-old male rats (Wistar). Rats were quickly killed with CO_2 and decapitated. Neurons were dissociated, centrifuged, and suspended twice in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated horse serum. Neurons were plated on poly-L-lysine-coated dishes and incubated in culture medium at 37°C (5% CO_2).

Current recording: Patch-clamp recording of $I_{K(M)}$ was performed in the whole-cell configuration with a List EPC-7 amplifier. Series resistance was 3–7 M Ω and partial compensation was sometimes used. Voltage pulse commands were generated and current records were sampled (5 kHz) and analyzed using BASIC-FASTLAB (Indec Systems) and Sigma Plot (SPSS Inc). $I_{K(M)}$ was activated by setting a holding voltage at –25 mV and deactivated by 500 ms command pulses from –25 mV to –60 mV (every 4 s). $I_{K(M)}$ deactivation amplitude and its percentage inhibition were measured as described [11]. Statistics are given as means \pm s.e.m.

Solutions: SCG cells were bathed with the following Ringer's solution (mM): 160 NaCl, 2.5 KCl, 5 CaCl₂, 1

MgCl₂, 10 HEPES, 8 glucose, 0.2 μM tetrodotoxin. The pH was adjusted to 7.4 with NaOH. The internal solution was (in mM): 175 KCl, 5 MgCl₂, 5 HEPES, 0.1 BAPTA, 5 ATP, 0.3 GTP, 0.1 leupeptin. The pH was adjusted at 7.4 with KOH. Imipramine (IMI) was applied by using a focal perfusion system (Automate Scientific, Inc.) which locally exchanges the external solution within 1 s. IMI treatment was for 40–60 s allowing it to attain its maximal effect. Experiments were done at room temperature.

Chemicals: Imipramine (RBI), HEPES and GTP (Sigma), BAPTA (Molecular Probes), leupeptin, dispase and ATP (Boehringer Mannheim), DMEM and horse serum heat-inactivated (Gibco).

RESULTS

Imipramine inhibits $I_{K(M)}$ in a dose-dependent and reversible manner: To test if $I_{K(M)}$ is affected by IMI, a concentration of 50 μM of the drug was initially used. Fig. 1a shows that IMI quickly reduces the deactivation amplitude of $I_{K(M)}$ (filled triangles). This effect of IMI has a comparable time course as for the inhibition by the external M-channel blocker Ba²⁺ (200 μM) [12]. At the holding potential of -25 mV $I_{K(M)}$ is fully activated (Fig. 2), therefore, its inhibition is also revealed by a downward shift in the holding current, as shown for the representative records from this experiment (Fig. 1ba,bb). The mean $I_{K(M)}$ inhibition by 50 μM IMI or 200 μM Ba²⁺ are 80 ± 3% and 39 ± 5% respectively (Fig. 1c, left). As well as being reversible, IMI inhibits $I_{K(M)}$ in a dose-dependent way with an IC₅₀ of 7 μM (Fig. 1c right). This value is identical to the IC₅₀ for IMI inhibition of the neuronal I_A (7 μM) and delayed rectifier (6.8 μM) K⁺ currents [8,9].

Inhibition of $I_{K(M)}$ is voltage-independent: IMI inhibits I_A by an open channel mechanism [8] and blockade of cloned HERG channels is weakly voltage dependent [10], indicating that IMI reduces K⁺ currents by different ways. Therefore we test the voltage dependence of the $I_{K(M)}$ inhibition by measuring its steady state activation curve before and until IMI attained its maximum effect. Figure 2a shows that IMI decreases the M-channel-mediated macroscopic conductance without noticeable changes on its activation curve, as indicated by the similar values of V_{0.5} (control = -55.8 ± 0.8 mV, IMI = -56.0 ± 0.7 mV) and slope factor (control = 6.4 ± 0.6, IMI = 6.8 ± 0.6) from the Boltzmann fits for the control (circles) and IMI condition (triangles). Indeed when the test values of conductance are scaled to the control, IMI does not produce any voltage shift of the activation curve (Fig. 2c). Thus IMI reduces $I_{K(M)}$ by a voltage-independent mechanism.

We sought for an open-channel mechanism of $I_{K(M)}$ inhibition. However IMI change neither the deactivation kinetics nor induce a time-dependent $I_{K(M)}$ inactivation. For the deactivation analysis, tail currents were fitted with a single exponential function yielding a time constant of 87.5 ± 7 ms (n = 9) and 87.8 ± 9 ms (n = 8) for the control and IMI treatment, respectively.

Internal imipramine reduces $I_{K(M)}$: The short latency and rapid reversibility of $I_{K(M)}$ inhibition suggests that IMI binds to M-channels at a site accessible from the external

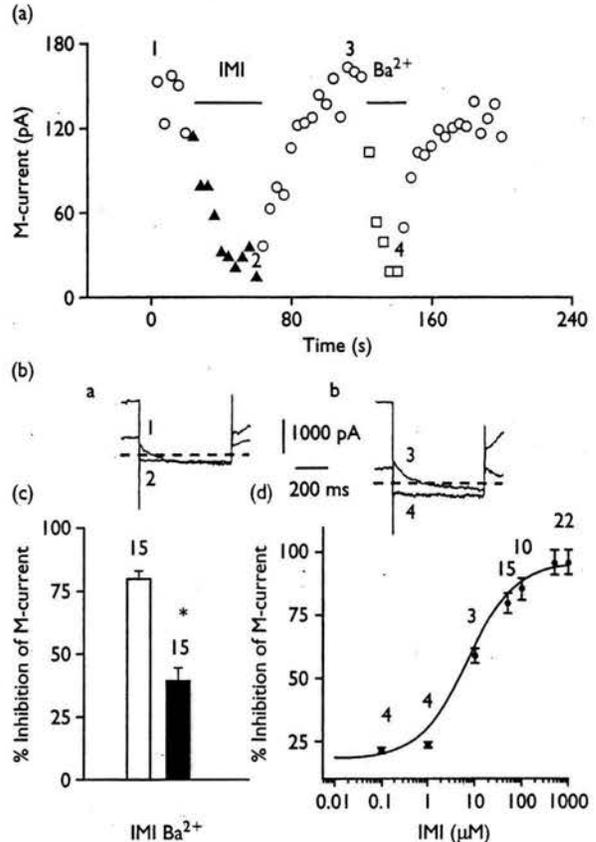


Fig. 1. Extracellular IMI inhibits M-current. (a) Symbols represent the amplitude of $I_{K(M)}$ measured every 4 s. IMI and Ba²⁺ were applied as indicated by the horizontal bars. IMI (50 μM) elicits a reversible strong inhibition of $I_{K(M)}$ (filled triangles) and Ba²⁺ (200 μM) blocks sensitive K⁺ current (open squares). (b) Superimposed $I_{K(M)}$ traces during a 500 ms test pulse to -60 mV from a holding potential of -25 mV, in the absence (ba1, bb3) or presence of IMI (ba2) and Ba²⁺ (bb4) from data in (a). (c) Aggregated data for inhibition of $I_{K(M)}$ by IMI and Ba²⁺; numbers above columns indicate the number of tested cells. Data plotted as mean ± s.e.m. * $p < 0.05$; t-test vs control. (d) Concentration-response relationship for $I_{K(M)}$ inhibition by IMI. Concentrations are plotted on a semi logarithmic scale and data were fitted with the logistic function, $y = [A_1 - A_2 / 1 + (X/X_0)^p] + A_2$ with EC₅₀ = 7 μM. The number of cells tested for each concentration stands above error bars.

side of the cell membrane. Indeed IMI does not affect I_A when applied internally in hippocampal neurons [8]. Despite this, we assessed whether IMI reduces $I_{K(M)}$ from inside by dialyzing the recorded neuron with the drug (50 μM) and vigorously bathing the cell, to prevent any action of internal IMI that might leak to the outside. Figure 3a shows that under these conditions external Ba²⁺ quickly reduces $I_{K(M)}$ and as soon as the blocker is washed-out, $I_{K(M)}$ has a tendency to increase. However its recovery is curtailed by a spontaneous and irreversible decrease of $I_{K(M)}$, presumably due to the dialysis of IMI. Representative records from this experiment are shown in Fig. 3b. In 16 cells IMI in pipette produces a mean inhibition of 47 ± 8% (Fig. 3c) and the mean latency for this spontaneous effect is

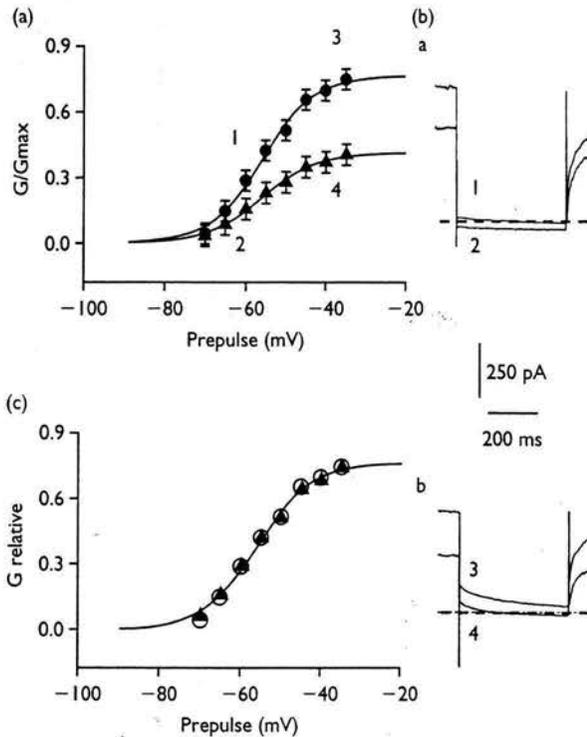


Fig. 2. M-channels conductance-voltage data fitted with a single Boltzmann function. (a) Conductance-voltage curve for M-channels was constructed with tail currents at -70 mV after depolarizing steps of 5 mV from a holding potential of -70 mV, before (circles) and during IMI ($10 \mu\text{M}$) exposure (triangles). The $V_{0.5}$ and slope factor values of the fitted Boltzmann functions are indicated in the main text ($n=4$). (b) Superimposed M current traces from the conductance-voltage curve during 500 ms test pulse to -60 mV (ba1, ba2) and to -35 mV (bb3, bb4), from a holding potential of -25 mV; control (ba1, bb3) and IMI (ba2, bb4). (c) Relative $I_{K(M)}$ conductance-voltage data in IMI (filled triangles) from data in (a) were scaled to match the control (open circles). Boltzmann fits are superimposed.

120 ± 4 s upon seal breakthrough. The mean effect of external Ba^{2+} is $41 \pm 8\%$ (Fig. 3c). Thus blockade of the M-channels also occurs when IMI is applied internally.

$I_{K(M)}$ inhibition by IMI is enhanced at pH 8: Previous work has shown that the uncharged forms of amitriptyline and IMI are more effective blockers of the delayed rectifier and I_A K^+ currents, respectively [8,9]. Therefore to assess whether the neutral form of IMI (n-IMI) is more effective than the charged form in inhibiting $I_{K(M)}$, the proportion of these chemical forms was changed by raising the external pH from 7.4 to 8. At pH 7.4 IMI is mostly charged, so in order to look for a clearest effect of n-IMI, a nominal concentration of $5 \mu\text{M}$ was used. Figure 4a shows that at pH 7.4 IMI produces a steady state inhibition of 45.8% (mean of the last five open triangles) but it rises to 88.3% at pH 8 (mean of the last five filled triangles). The enhanced effect of IMI at pH 8 is quite reproducible as shown in Fig. 4b. Thus the mean inhibition increases from $45.4 \pm 3\%$ to $76.9 \pm 2\%$ ($n=13$).

To test for any direct effect of pH on $I_{K(M)}$ its current density was measured. Changing the pH from a physiolo-

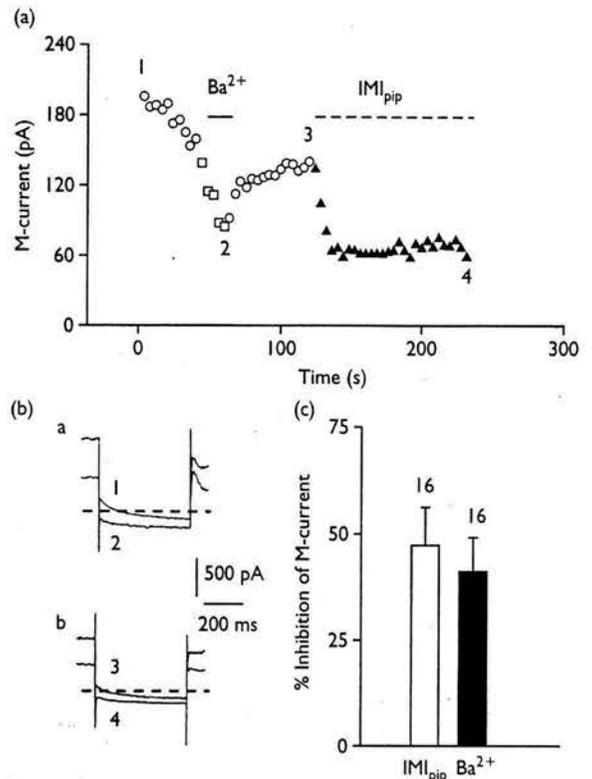


Fig. 3. Intracellular IMI inhibits M-current. (a) Symbols represent the amplitude of $I_{K(M)}$ deactivation measured every 4 s. External Ba^{2+} ($200 \mu\text{M}$) was applied as indicated by the horizontal bar and the inhibitory effect of IMI in pipette ($50 \mu\text{M}$) is highlighted by the filled triangles and the dashed line. (b) Superimposed $I_{K(M)}$ traces during a 500 ms (test pulse) to -60 mV from a holding potential of -25 mV, in the absence (ba1, bb3) or presence of Ba^{2+} (ba2) and IMI (bb4) from data in (a). (c) Data summary for inhibition of $I_{K(M)}$ by IMI in pipette and external Ba^{2+} ; numbers above individual columns represent the number of tested cells. Data plotted as mean \pm s.e.m. * $p < 0.05$; t-test vs control.

gical value to an alkaline level has no significant effect on $I_{K(M)}$ current density (Fig. 4c). The mean $I_{K(M)}$ current density at pH 7.4 and 8 are 1.5 ± 0.1 pA/pF and 1.6 ± 0.1 pA/pF, respectively. Consequently the larger $I_{K(M)}$ inhibition seen at pH 8 may be due to a higher effective concentration of n-IMI (see below).

DISCUSSION

The present results show that IMI reversibly reduces $I_{K(M)}$ in a dose-dependent and pH-sensitive way. It is noticeable that inhibition of $I_{K(M)}$ is in part different than for other voltage-dependent K^+ currents [8,10]. For instance IMI inhibits I_A with an increased inactivation rate [8], as expected for an open-channel blocking mechanism [13]. In contrast IMI neither changed the steady state activation of $I_{K(M)}$ nor its kinetics of activation or deactivation, suggesting that opening of the M-channels is not a requirement for their blockade. Moreover IMI in pipette reduces $I_{K(M)}$ whereas internal IMI does not affect to I_A [8]. Thus IMI may block several ion channels by different mechanisms and sites of actions (see below).

Pertussis toxin disrupts IMI suppression of L-type Ca^{2+}

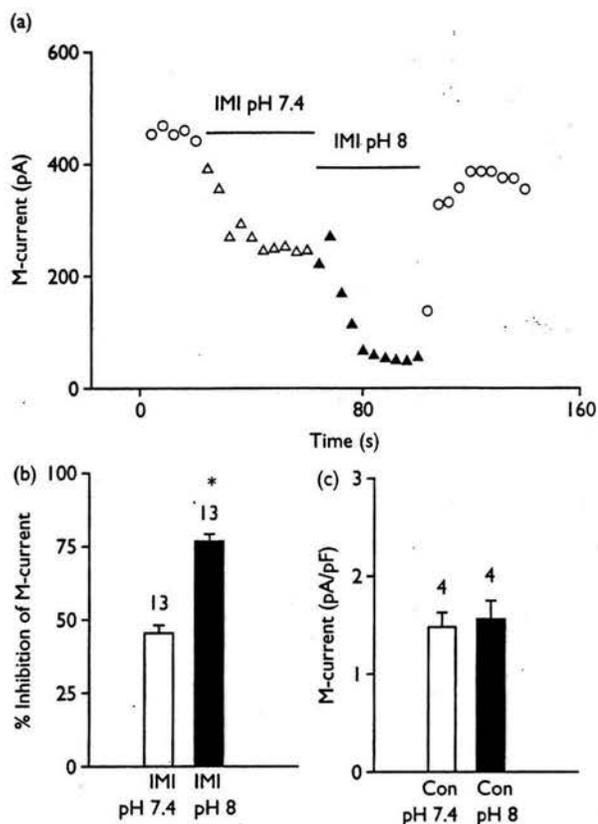


Fig. 4. Effect of pH on M-current inhibition by IMI. Symbols represent the amplitude of $I_{K(M)}$ deactivation measured every 4 s. (a) IMI ($5 \mu\text{M}$) was applied as indicated by the horizontal bars, at pH 7.4 (open triangles) and pH 8 (filled triangles). (b) Data summary for inhibition of $I_{K(M)}$ by IMI at pH 7.4 and pH 8. (c) Data summary for M-current density at pH 7.4 and pH 8. Numbers above individual columns represent the number of tested cells.

channels from dorsal root ganglion neurons [14]. Moreover in cortical neurons IMI stimulates IP_3 production and raises intracellular Ca^{2+} , effects occluded by muscarinic or bradykinin receptor stimulation [15]. Therefore IMI may act through stimulation of the G-protein signaling pathways that endogenously modulate $I_{K(M)}$ [1,11]. To assess whether IMI acts via a G-protein-linked mechanism, its effect was evaluated in neurons dialyzed for 10 min with the G-protein signaling blocker GDPaS, and muscarinic $I_{K(M)}$ inhibition was used as a positive control. As expected, GDPaS disrupted the receptor-mediated inhibition of $I_{K(M)}$, but neither the extent nor the kinetics of $I_{K(M)}$ inhibition by IMI was changed (not shown). Thus G-proteins do not underlie the effect of IMI on $I_{K(M)}$. Despite IMI might activate a Ca^{2+} signal and inhibit $I_{K(M)}$ via a direct action of Ca^{2+} , or a Ca^{2+} -sensitive protein, on the M-channel [15,16]. However dialysis of 20 mM BAPTA, a procedure that readily disrupts receptor-mediated inhibition of $I_{K(M)}$ [11], did not prevent the effect of external IMI (not shown).

Thus our results suggest that IMI mostly binds to the M-channel protein to inhibit $I_{K(M)}$, although we cannot exclude the contribution of a Ca^{2+} -dependent mechanism, particularly when IMI is provided via the internal solution.

Raising the pH from 7.4 to 8 enhanced the effectiveness of IMI in reducing $I_{K(M)}$. Because alkaline external solutions by itself do not affect to $I_{K(M)}$ (Fig. 4c) and others voltage-dependent currents as well [13], we suggest that the larger effect of IMI at pH 8 results from an increment of n-IMI concentration. IMI is a weak base with pK_a of 9.5, therefore using the Henderson-Hasselbach equation and $5 \mu\text{M}$ nominal IMI, the estimated concentrations of n-IMI at pH 7.4 and 8 are 39.4 nM and 153.2 nM, respectively. Hence this rise of n-IMI increased mean inhibition from $45.4 \pm 3\%$ to $76.9 \pm 2\%$. Thus n-IMI may be the active form that readily inhibits $I_{K(M)}$. Furthermore a neutral molecule interacting with the M-channel is quite compatible with the lack of voltage-dependent effects of IMI.

Inhibition of $I_{K(M)}$ by therapeutic concentrations of IMI can produce a long lasting and profound enhancement of neuronal excitability. A consequence of drug-induced $I_{K(M)}$ inhibition and the resulting neuronal firing might be the stimulation of neurotransmitter release [7]. Indeed in SCG neurons the relatively selective M-channel blocker linopirdine induces noradrenaline release, with a latency and time course that parallels $I_{K(M)}$ inhibition [17]. Thus it would be interesting to test in central neurons whether IMI enhances monoaminergic neurotransmission by stimulating spontaneous or evoked noradrenaline or 5-HT release.

CONCLUSION

The antidepressant drug imipramine reversibly reduces $I_{K(M)}$ by a voltage-independent mechanism. Inhibition of $I_{K(M)}$ is mostly mediated by the neutral form of imipramine. This suggests that IMI directly binds to the M-channels, presumably in the resting state.

REFERENCES

- Brown DA. *Trends Neurosci* 11, 294–299 (1988).
- Madison DV and Nicoll RA. *J Physiol* 354, 319–331 (1984).
- Bosma MM and Hille B. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 2943–2947 (1989).
- Jones S, Brown DA, Milligan G et al. *Neuron* 14, 399–405 (1995).
- Shapiro MS, Wollmuth LP, Hille B. *Neuron* 12, 1319–1329 (1994).
- Fukuda H, Nishida A, Saito H et al. *Neurochem Int* 25, 567–571 (1994).
- Bouron A and Chatton JY. *Neuroscience* 90, 729–736 (1999).
- Kuo CC. *Biophys J* 12, 2845–2857 (1998).
- Wooltorton JRA and Mathie A. *Br J Pharmacol* 110, 1126–1132 (1993).
- Teschemacher AG, Seward EP, Hancox JC et al. *Br J Pharmacol* 128, 479–485 (1999).
- Cruzblanca H, Koh DS, Hille B. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 7151–7156 (1998).
- Stansfeld CE, Marsh SJ, Gibb AJ et al. *Neuron* 10, 639–654 (1993).
- Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland: Sinauer Associates Inc; 1992.
- Choi JJ, Huang GJ, Shafiq E et al. *J Pharmacol Exp Ther* 263, 49–53 (1992).
- Shimizu M, Nishida A, Hayakawa H et al. *J Neurochem* 60, 595–601 (1993).
- Selyanko AA and Brown DA. *Neuron* 16, 151–162 (1996).
- Kristufek D, Koth G, Motejlek A et al. *J Neurochem* 72, 2083–2091 (1999).

Acknowledgements: This work was supported by a CONACyT grant 34542-N to H.C., a CONACyT grant 33942-N and a DGAPA-UNAM grant IN213400 to D.E.G., the PEW Latin American Fellows Program in Biomedical Sciences to H.C. and an Alexander von Humboldt Stiftung Fellowship to D.E.G. We thank R.E. García-Ferreiro his participation in some preliminary experiments.