

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**EL RECEPTOR COLINÉRGICO DE LAS CÉLULAS  
CILIADAS DE LA CÓCLEA**

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires



Autor:	Lic. María Eugenia Gómez Casati
Directora de tesis:	Dra. Ana Belén Elgoyhen
Directora asistente:	Dra. Eleonora Katz
Consejero de estudios:	Dr. Marcelo Rubinstein
Lugar de trabajo:	Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI), CONICET.

Buenos Aires, octubre de 2006

## ***Agradecimientos***

*A la Dra. Belén Elgoyhen y a la Dra. Eleonora Katz por darme la oportunidad de unirme a este grupo, por permitirme trabajar con libertad, por el permanente apoyo y ayuda y por enseñarme, formarme e incentivar-me durante mi formación científica.*

*A Belén por estar siempre cuando la necesité, por sus consejos y por hacer que estos cinco años de trabajo hayan sido un placer.*

*A Eleo por enseñarme no sólo electrofisiología, sino además todo lo que se requiere para llevar adelante un buen trabajo científico. Por su tiempo, dedicación y sobre todo paciencia. Por estar siempre ahí para ayudar en lo que sea.*

*A todos mis compañeros de laboratorio, por los buenos momentos compartidos. Por hacer que el laboratorio sea una gran familia y por todo el apoyo y ayuda que me brindaron.*

*Julián, por ser un amigazo, por preocuparse y ayudarme en todo. Por las largas charlas científicas y no científicas en la siembra.*

*Pao, con su dulzura, calidez y ayuda permanente. Por enseñarme miles de cosas.*

*Jime y Marce, por estar siempre dispuestas a ayudar y por su compañía.*

*Vivi, por su alegría constante y afecto.*

*Jessi, por su buena onda y por estar siempre dispuesta a ayudar y escuchar.*

*Javi, con sus ganas de aprender y ayudar.*

*Lucia, por su aporte evolutivo.*

*A Leonel, por ser tan buena gente y por la ayuda con los ratones.*

*Ana y Carla, por haberme ayudado un montón en mi primer año en el lab.*

*La Caro, por ser una gran amiga, por las charlas, anécdotas y por hacer que las horas de trabajo fueran más cortas y divertidas. Por estar ahí en todo momento al pie del cañón.*

*Guchi, gran compañero de mates, por su enorme generosidad, por las Barcelonas compartidas y por sobre todo por ser un gran amigo.*

*Santi, por su bondad, amistad, ayuda y por sacarme siempre una sonrisa. Por los asaditos, picaditas y las largas charlas.*

*Pomata, por su compañerismo y ayuda permanente.*

*Ceci y Luchi, por la ayuda y la sonrisa de todos los días.*

*Gracias a todos por compartir conmigo el día a día del laboratorio, los almuerzos, las discusiones de política, las charlas de cine, música, cocina, las tardes de mate y de radio mitre, por ayudarme a que llegara este momento y hacer del laboratorio un gran lugar en el cual trabajar es productivo.*

*A Dani Calvo, por su ayuda y por las charlas gastronómicas, musicales y cinematográficas compartidas.*

*A Malarini, por su buena onda, la sonrisa de todos los días y por las charlas de pasillo.*

*Al Dr. Torres y a la Dra. Flawia, y a todo el INGEBI, por darme un lugar donde desarrollar mi tesis de doctorado.*

*Al CONICET, por haber destinado recursos para mi formación científica.*

*A la Universidad de Buenos Aires y a la Universidad de Rosario, porque me permitieron acceder a una excelente educación pública y gratuita y me dieron la oportunidad de formarme y llegar a desarrollar y defender mi tesis de doctorado.*

*A Nati, la mejor co-equiper que hay.*

*A Damián, Mariel y Ana, por los años de mates, charlas y días enteros estudiando en alguna casa. Por convertirse en grandes amigos.*

*A la Lore, Jaru, Nerina, la negra por ser unas buenas amigas y estar conmigo en los momentos que las necesito.*

*A la Geo, por estar todos los días conmigo, por las salidas, por soportarme en los momentos más difíciles y por su generosidad.*

*A la Flore, por ser mas que una amiga, una hermana. Por entenderme aún en la distancia.*

*A mis primos y tíos (los casatis) por estar siempre dispuestos a ayudarme y porque siempre quisieron lo mejor para mí.*

*A Susi por recibirme siempre con un abrazo y un mate y por estar siempre.*

*A Vicki por ser una gran cuñada, por sus consejos y ayuda y por las ganas de remar en las reuniones familiares.*

*A mis padres y a mi hermano, por su apoyo incondicional y por todo el esfuerzo realizado en brindarme una educación. Por apoyarme y alentarme siempre. Por enseñarme, sobre todo aquellas cosas de la vida que no se aprenden en la Universidad y por estar siempre conmigo y quererme un montón.*

Los resultados de esta tesis fueron publicados en:

**María E. Gómez-Casati**, Eleonora Katz, Elisabeth Glowatzki, María L Lioudyno, Paul Fuchs, A. Belén Elgoyhen. (2004). Linopirdine blocks  $\alpha 9\alpha 10$ -containing nicotinic cholinergic receptors of cochlear hair cells. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology (JARO)*, 5(3): 261-269.

Eleonora Katz, A. Belén Elgoyhen, **María E. Gómez-Casati**, Marlies Knipper, Douglas E. Vetter, Paul A. Fuchs, Elisabeth Glowatzki. (2004). Developmental regulation of nicotinic synapses on cochlear inner hair cells. *The Journal of Neuroscience*, 24(36):7814-7820.

**María E. Gómez-Casati**, Paul A. Fuchs, A. Belén Elgoyhen, Eleonora Katz. (2005). Biophysical and pharmacological characterization of nicotinic cholinergic receptors in cochlear inner hair cells. *The Journal of Physiology*, 566(Pt 1): 103-118.

J. Michael McIntosh, Paola V. Plazas, Maren Watkins, **María E. Gómez-Casati**, Baldomero M. Olivera, A. Belén Elgoyhen. (2005). A novel  $\alpha$ -conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis* discriminates between rat  $\alpha 9\alpha 10$  and  $\alpha 7$  nAChRs. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(34):30107-30112.

Michael Ellison, Christian Haberlandt, **María E. Gómez-Casati**, Maren Watkins, A. Belén Elgoyhen, J. Michael McIntosh, Baldomero M. Olivera. (2006). alpha-RgIA: A Novel conotoxin which specifically and potently blocks the alpha9alpha10 nAChR. *Biochemistry*, 45(5):1511-1517.

## Abreviaturas

$\alpha$ -CTx: alfa-conotoxina

ACh: acetilcolina

ADN: ácido deoxirribonucleico

ADNc: ácido deoxirribonucleico copia

ARN: ácido ribonucleico

ARNc: ácido ribonucleico copia

BAPTA-AM: acetometilester del ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N, N, N', N', - tetraacético

BK: canal de potasio dependiente de calcio de conductancia grande

CCEs: células ciliadas externas

CCIs: células ciliadas internas

CDs: células de Deiters

CE<sub>50</sub>: concentración efectiva para lograr el 50% de la respuesta

CI<sub>50</sub>: concentración efectiva para el lograr el 50% de inhibición

$C_m$ : capacitancia de la membrana

DMPP: 1,1-dimetil-4-fenilpiperazinio

E  $x$ :  $x$  días de estadio embrionario

EGTA: ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetil ester)-N,N,N',N'-tetraacético

$E_K$ : potencial de equilibrio del potasio

$E_{rev}$ : potencial de reversión aparente

*et al.*: *Et alter* (y otros)

$F$ : constante de Faraday

$G$ : conductancia

GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GHK: Goldman-Hodgkin-Katz

HEPES: N-(2-hidroxietil)piperazina-N'ácido-(2-etansulfónico)

hs: horas

$I$ : corriente

$I_{m\acute{a}x}$ : corriente máxima

$I-V$ : corriente en función del potencial

ICS 205,930: tropisetron

kHz: kilohertz

Lin: linopiridina

M1-M4: segmentos transmembranales 1 al 4

MB: membrana basilar

MΩ: megaohmio

min: minutos

mm, μm: mili y micrómetros

mV: milivoltios

nAChR: receptor colinérgico nicotínico

$n_H$ : coeficiente de Hill

nl, μl: nano y microlitros

nM, μM, mM: nano, micro y milimoles por litro

P  $x$ :  $x$  días postnatal

$P_{Ca}/P_{Na}$ : permeabilidad al calcio relativa a la permeabilidad al sodio

pA, nA: pico y nanoamperios

$R$ : constante de los gases

s: segundos

S.E.M.: error estándar de la media

SK2: canal de potasio dependiente de calcio de conductancia pequeña

$T$ : temperatura absoluta

$V$ : voltaje

$V_m$ : potencial de membrana

# EL RECEPTOR COLINÉRGICO DE LAS CÉLULAS CILIADAS DE LA CÓCLEA

## RESUMEN

La hipótesis que se evaluó en el presente trabajo es que el receptor colinérgico que media la sinapsis entre las fibras eferentes olivococleares mediales y las células ciliadas internas de la cóclea de mamíferos está compuesto por las subunidades nicotínicas  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ .

En la primera parte, estudiamos las propiedades biofísicas y farmacológicas del receptor colinérgico nicotínico (nAChR) nativo presente en las células ciliadas internas (CCIs) de la cóclea antes del comienzo de la audición. Para ello, realizamos registros de *patch-clamp* en la configuración *whole-cell* en una preparación aguda del órgano de Corti de ratas de 9 a 11 días postnatal (P9-P11). La caracterización del nAChR nativo de las CCIs fue realizada aislándolo del canal SK2, para poder luego comparar sus propiedades con aquellas obtenidas para los receptores recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  expresados en oocitos de *Xenopus laevis*. El perfil farmacológico y la permeabilidad al calcio del receptor nativo fueron idénticos a los descritos para los receptores recombinantes tanto  $\alpha 9$  como  $\alpha 9\alpha 10$ . Sin embargo, cuando se compararon otras características biofísicas se observó que el receptor nativo de las CCIs es similar al nAChR recombinante heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ . Los resultados obtenidos en este apartado sugieren que el receptor de las CCIs es un heterómero compuesto por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  y no un homómero compuesto sólo por la subunidad  $\alpha 9$ .

La subunidad nicotínica  $\alpha 9$  se expresa en las CCIs de la cóclea desde estadios embrionarios hasta la adultez. En cambio, la subunidad  $\alpha 10$  deja de expresarse en estas células luego del comienzo de la audición. En la segunda parte, analizamos la ontogenia de las respuestas colinérgicas en las CCIs desde la llegada de las fibras olivococleares mediales (P1-P3) hasta el comienzo de la audición (P12-P13) y en días posteriores al mismo (P14-P22), para analizar si existía una correlación directa entre la expresión de la subunidad  $\alpha 10$  y la sensibilidad colinérgica de las CCIs. Los registros electrofisiológicos mostraron que la sinapsis entre las fibras eferentes olivococleares y las CCIs es funcional a partir de P3 y continúa transmitiendo señales hasta P13-P14. Luego de P14, las CCIs no responden a la acetilcolina liberada de los terminales pre-sinápticos ni a la aplicada de manera exógena. Nuestros resultados muestran que luego del comienzo de la audición, las CCIs carecen de nAChR funcionales y que esto se correlaciona con la disminución en la expresión de la subunidad  $\alpha 10$ .

El estudio de las respuestas electrofisiológicas de las células ciliadas externas (CCEs) de la cóclea resulta dificultoso por la presencia de una corriente de potasio ( $I_{K,n}$ ) que impide fijar el voltaje de estas células a potenciales hiperpolarizados. Esta corriente es bloqueada por la linopiridina y se ha utilizado esta droga para estudiar las respuestas colinérgicas de las CCEs. En la tercer parte, reportamos el efecto de la linopiridina sobre el nAChR nativo de las células ciliadas y sobre el receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  expresado en oocitos de *Xenopus laevis*. Demostramos que la linopiridina bloquea a los nAChRs de las células ciliadas y al receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  con la misma potencia. Estos resultados, además de contribuir a la caracterización farmacológica del receptor, indican que la linopiridina tiene un efecto directo sobre el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  y que por lo tanto no debería utilizarse para estudiar las respuestas colinérgicas de las CCEs.

*Palabras clave: receptores nicotínicos, células ciliadas de la cóclea, acetilcolina, modulación por calcio, desarrollo, inervación eferente, linopiridina.*

# THE NICOTINIC CHOLINERGIC RECEPTOR PRESENT IN COCHLEAR HAIR CELLS

## ABSTRACT

Our working hypothesis is that the cholinergic receptor that mediates synaptic transmission between medial olivocochlear efferent fibers and hair cells is composed of both the  $\alpha 9$  and  $\alpha 10$  nicotinic subunits.

In the first part, we performed a biophysical and pharmacological characterization of the nicotinic cholinergic receptor (nAChR) present in cochlear inner hair cells (IHCs) before the onset of hearing. This was done by *patch-clamp* recordings in the *whole-cell* mode, in IHCs from acutely excised apical turns of the organ of Corti of rats at postnatal ages 9-11 (P9-P11). The characterization of the native nAChR was studied in isolation from the associated SK2 channel in order to compare its properties to those of the recombinant  $\alpha 9$  and  $\alpha 9\alpha 10$  receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. The pharmacological profile and calcium permeability of the native IHC nAChR were found to be identical to those described for both the  $\alpha 9$  and  $\alpha 9\alpha 10$  recombinant nAChRs. However, when comparing other biophysical characteristics, the native IHC nAChR resembles more closely the heteromeric  $\alpha 9\alpha 10$  nAChR. These results suggest that the native receptor of IHCs is an heteromeric receptor composed of both  $\alpha 9$  and  $\alpha 10$  subunits, and not a homomeric receptor composed of only the  $\alpha 9$  subunit.

IHCs express the  $\alpha 9$  nicotinic subunit from embryonic stages to adulthood. In contrast, IHCs cease to express the  $\alpha 10$  subunit after the onset of hearing. To evaluate the requirement of  $\alpha 10$  in functional nAChRs, we charted the cholinergic sensitivity of cochlear IHCs since the arrival of olivocochlear efferent fibers (P1-P3) until the onset of hearing (P12-P13) and in subsequent days (P14-P22). Electrophysiological recordings showed that the synapse between efferent fibers and IHCs is functional from P3 and continue transmitting until P13-P14. After P14, IHCs did not respond to either synaptically released or exogenously applied acetylcholine. Our results demonstrate that after the onset of hearing, IHCs lack functional nAChRs and that this is correlated with a reduction in the expression of the  $\alpha 10$  subunit.

Electrophysiological studies in cochlear outer hair cells (OHCs) are hindered by the presence of a large potassium current ( $I_{K,n}$ ) that prevents holding these cells at hyperpolarized potentials.  $I_{K,n}$  can be blocked by linopirdine and this compound has been used in OHCs to study the cholinergic responses of these cells. In the third part, we report the effect of linopirdine on the native receptor of cochlear hair cells and on the recombinant  $\alpha 9\alpha 10$  receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. We show that linopirdine was able to block the native and the recombinant  $\alpha 9\alpha 10$  nAChRs with similar potency. Apart from contributing to the pharmacological characterization of the receptor, these results indicate that linopirdine has a direct effect on the nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ , and it should not be used to study the cholinergic responses of OHCs.

*Key words: nicotinic receptors, cochlear hair cells, acetylcholine, modulation by calcium, development, efferent innervation, linopirdine.*



<b>Introducción</b> .....	1
<i>El oído: estructura general y función.</i> .....	2
<i>El órgano de Corti y la transducción de señales auditivas.</i> .....	2
<i>Patrón de inervación de las células ciliadas de la cóclea de mamíferos adultos.</i> .....	5
<i>La función de las CCEs se encuentra bajo influencia del sistema nervioso central.</i> .....	7
<i>Estructura primaria del receptor colinérgico de las CCEs.</i> .....	8
<i>Importancia del receptor colinérgico durante el desarrollo de las CCEs.</i> .....	12
<i>Receptores colinérgicos.</i> .....	16
<i>Los receptores colinérgicos nicotínicos.</i> .....	16
<i>Diversidad de receptores nicotínicos.</i> .....	18
<i>Propiedades generales.</i> .....	19
<i>Modulación por el Ca<sup>2+</sup>.</i> .....	20
<b>Objetivos</b> .....	23
<b>Materiales y Métodos</b> .....	24
<b>Diseción del órgano de Corti y registros electrofisiológicos en las células ciliadas.</b>	
<i>Preparación del órgano de Corti.</i> .....	24
<i>Registros electrofisiológicos en las células ciliadas.</i> .....	24
<i>Soluciones.</i> .....	25
<i>Evaluación de la permeabilidad al Ca<sup>2+</sup>.</i> .....	28
<i>Evaluación de la modulación por cationes divalentes.</i> .....	29
<i>Evaluación de la inhibición.</i> .....	29
<i>Evaluación del efecto del Ca<sup>2+</sup> sobre la afinidad del receptor por la ACh.</i> .....	30
<i>Análisis de las curvas I-V y de las corrientes sinápticas</i> .....	30
<b>Expresión de receptores recombinantes en oocitos de xenopus laevis y registros electrofisiológicos.</b>	
<i>Producción de ARNc.</i> .....	31
<i>Obtención y preparación de los oocitos para la inyección.</i> .....	31
<i>Inyección del ARNc.</i> .....	32
<i>Registros electrofisiológicos en oocitos.</i> .....	32

<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>34</b>
<b>Drogas utilizadas.....</b>	<b>34</b>

## **PARTE I**

### ***Caracterización biofísica y farmacológica del receptor colinérgico nicotínico presente en las células ciliadas internas de la cóclea de ratas***

<b>Introducción .....</b>	<b>36</b>
<i>Aislamiento de las corrientes a través del nAChR de las corrientes a través del canal SK2. ...</i>	<i>38</i>
<i>Patrón de desensibilización del receptor nativo de las CCIs.....</i>	<i>39</i>
<i>Evaluación de la permeabilidad al calcio del receptor nativo de las CCIs.....</i>	<i>41</i>
<i>Modulación del receptor nativo de las CCIs por Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> .....</i>	<i>42</i>
<i>Mecanismo de potenciación por el Ca<sup>2+</sup> .....</i>	<i>46</i>
<i>Mecanismo de bloqueo por cationes divalentes. ....</i>	<i>47</i>
<i>Modulación de las corrientes sinápticas por el Ca<sup>2+</sup> extracelular. ....</i>	<i>48</i>
<i>Perfil farmacológico del receptor nativo de las CCIs.....</i>	<i>52</i>
<b>Discusión.....</b>	<b>58</b>
<i>Sensibilidad al voltaje y patrón de desensibilización del receptor nativo de las CCIs.....</i>	<i>59</i>
<i>Permeabilidad al calcio del receptor nativo de las CCIs.....</i>	<i>60</i>
<i>Efecto de los cationes divalentes sobre el receptor nativo de las CCIs. ....</i>	<i>61</i>
<i>El calcio modula las corrientes sinápticas a través del nAChR.....</i>	<i>63</i>
<i>Mecanismo de potenciación y bloqueo por iones divalentes.....</i>	<i>64</i>
<i>Perfil farmacológico del nAChR nativo de las CCIs.....</i>	<i>65</i>
<i>Implicancias Fisiológicas.....</i>	<i>68</i>
<i>Conclusión. ....</i>	<i>68</i>

## **PARTE II**

### ***Desarrollo de la funcionalidad de la sinapsis colinérgica nicotínica en las células ciliadas internas de la cóclea de ratas***

<b>Introducción .....</b>	<b>70</b>
---------------------------	-----------

<b>Resultados</b> .....	72
<i>Estudio de las respuestas colinérgicas en las CCI durante el desarrollo.</i> .....	72
<i>Acople del nAChR <math>\alpha 9\alpha 10</math> con el canal SK2.</i> .....	75
<b>Discusión</b> .....	81
<i>Variación de las respuestas colinérgicas en las CCI durante el desarrollo.</i> .....	81
<i>La actividad del nAChR de las CCI se correlaciona con la expresión de la subunidad <math>\alpha 10</math> durante el desarrollo.</i> .....	81
<i>Acople entre la respuesta colinérgica y la activación del canal SK2.</i> .....	83
<i>Expresión de nAChR <math>\alpha 9\alpha 10</math> funcionales y actividad sináptica eferente.</i> .....	84
<i>Conclusión.</i> .....	86

### **PARTE III**

#### ***Efecto de la linopiridina sobre el nAChR coclear nativo y el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ recombinante***

<b>Introducción</b> .....	88
<b>Resultados</b> .....	90
<i>Efecto de la linopiridina sobre el nAChR de las células ciliadas de la cóclea de ratas.</i> .....	90
<i>Efecto de la linopiridina sobre el nAChR recombinante <math>\alpha 9\alpha 10</math> expresado en oocitos de <i>Xenopus laevis</i>.</i> .....	91
<b>Discusión</b> .....	96
<i>Efecto de la linopiridina sobre el nAChR <math>\alpha 9\alpha 10</math> nativo y recombinante.</i> .....	96
<i>Conclusión.</i> .....	98

<b>Conclusiones</b> .....	99
---------------------------	----

<b>Bibliografía</b> .....	101
---------------------------	-----

## **Introducción**

Todo el conocimiento de este mundo es adquirido a través de nuestros sentidos. La habilidad para comunicarse es un atributo que nos permite a los seres humanos transmitir conceptos complejos entre los individuos, familias, culturas y generaciones. La comunicación verbal es también el medio por el cual compartimos emociones, actitudes, ideas, hechos y conceptos abstractos. La pérdida de la audición durante el desarrollo o en la madurez tiene por lo tanto un profundo impacto sobre nuestra capacidad para comunicarnos con los otros miembros de la especie e impone un límite muy severo en nuestra calidad de vida. Se estima que 1 de cada 10 personas en el mundo tiene una deficiencia auditiva. Esta situación constituye una realidad que hace aún más necesario el estudio del sentido de la audición. En los últimos años, se han obtenido enormes avances en el campo de la fisiología auditiva. Estos incluyen el abordaje computacional de la mecánica coclear y la comprensión al nivel celular y molecular del proceso de la audición.

El epitelio sensitivo del órgano de la audición en los humanos posee sólo unas 16000 células receptoras (Dallos, 1992), las cuales son extremadamente vulnerables. El trauma acústico, las drogas ototóxicas y el envejecimiento pueden producir la pérdida irreversible de las mismas, ya que estas células son incapaces de regenerarse en mamíferos. El avance en el entendimiento de la fisiología auditiva ha sido muy lento. En particular, la dificultad de acceso experimental a los órganos que constituyen este sistema y el requisito de técnicas sumamente sensibles, han demorado el desarrollo de este área del conocimiento. El descubrimiento de nuevas metodologías, como técnicas electrofisiológicas y de biología molecular, ha permitido revertir esta situación en las últimas décadas. El surgimiento de la genética molecular de la audición ha permitido identificar los genes responsables de más de 50 sorderas no sindrómicas, así como un centenar de genes involucrados en la fisiología coclear.

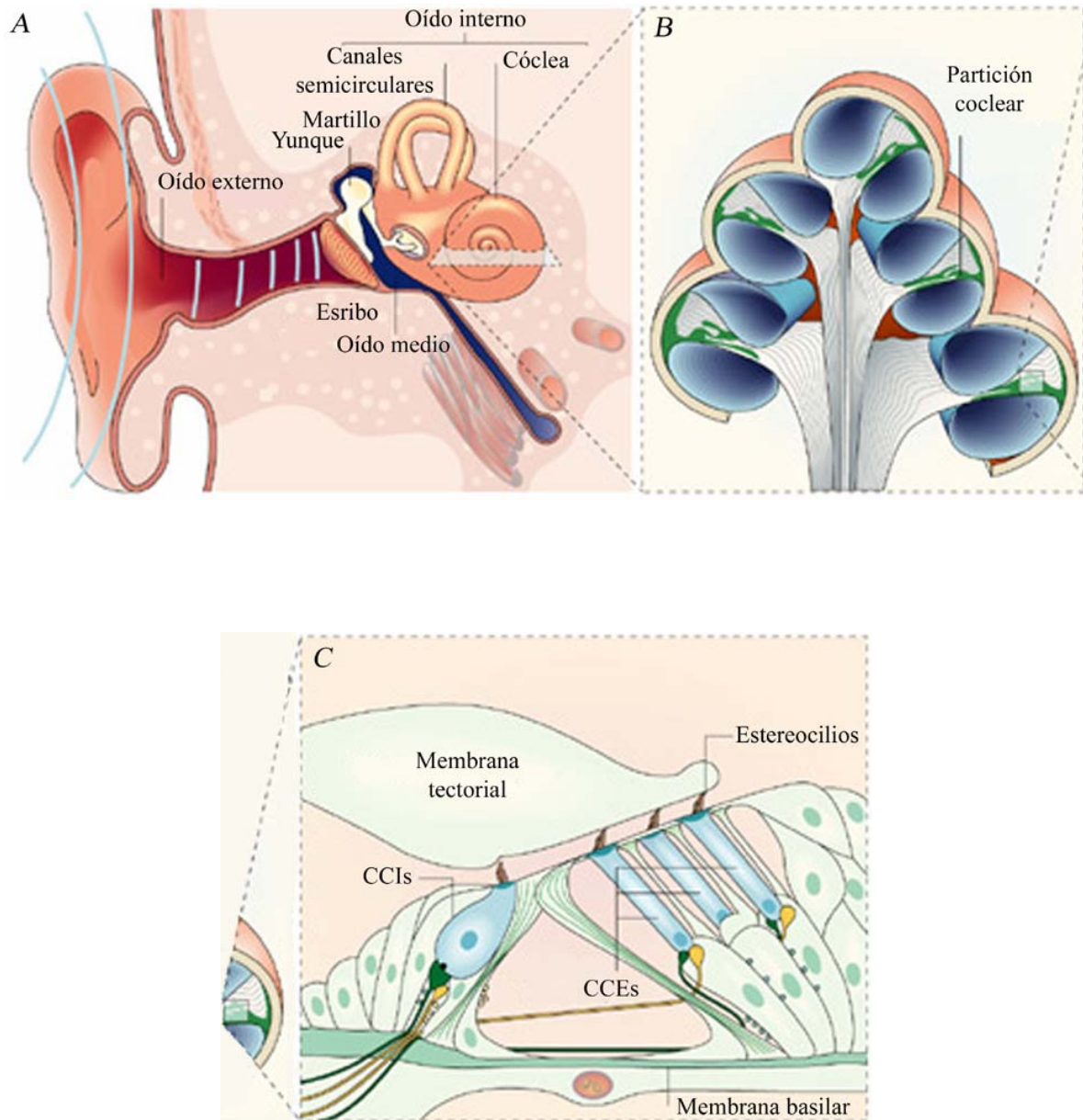
El trabajo que aquí se presenta, comprende los resultados obtenidos durante mi formación como estudiante de doctorado. Durante este período hemos estudiado las propiedades farmacológicas y biofísicas del receptor nicotínico (nAChR) nativo, presente en las células ciliadas de la cóclea.

*El oído: estructura general y función.*

La estructura anatómica del oído puede dividirse en tres partes: oído externo, medio e interno, que se ilustran en la *Figura 1A*. En primer lugar se encuentra el oído externo, cuya función principal es la de recolectar los estímulos sonoros y dirigirlos hacia las células sensoriales que se encuentran en el oído interno. El oído externo se extiende desde la superficie corporal hasta la membrana timpánica. Comenzando con esta membrana, se ubica el oído medio que incluye al tímpano y a la cadena más pequeña de huesos en el cuerpo humano: el martillo, el yunque y el estribo. El resto del oído medio está lleno de aire. La base del martillo está unida a la membrana timpánica, y la base del estribo está adosada a una membrana que cubre una abertura en la estructura ósea del oído interno. Esta abertura es la ventana oval, y su cubierta membranosa separa el oído medio lleno de aire de la cóclea, que está llena de líquido. Las señales sonoras que impactan en la membrana timpánica provocan la vibración posterior de estos pequeños huesos. Este movimiento se transduce luego en cambios de presión en los líquidos que bañan los epitelios auditivo y vestibular. En último lugar, se encuentra el oído interno que contiene los epitelios sensitivos del equilibrio, en el aparato vestibular y de la audición, en la cóclea, una estructura en forma de espiral (*Figura 1B*).

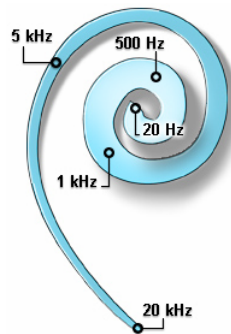
*El órgano de Corti y la transducción de señales auditivas.*

El órgano de Corti, que recibe su nombre debido al primer anatomista en dar una descripción detallada del mismo, constituye el epitelio sensitivo de la cóclea. Este órgano contiene las células ciliadas, que son las responsables de la transducción de los estímulos auditivos en señales eléctricas que son luego transmitidas y procesadas por el sistema nervioso central (*Figura 1C*). El órgano de Corti descansa sobre la membrana basilar y está bañado por dos fluidos cocleares distintos: la endolinfa, que es una solución que contiene alto potasio, en la zona apical y la perilinfa, que es rica en sodio, en la región basolateral. Cuando los estímulos sonoros atraviesan el oído externo, presionan la membrana timpánica y son luego conducidos mecánicamente a través de la pequeña cadena ósea del oído medio. Los movimientos del estribo sobre la membrana que cubre la ventana oval, son traducidos en cambios de presión en los fluidos cocleares, generándose



**Figura 1: Estructura anatómica del oído.** A, dibujo que muestra las estructuras anatómicas del oído externo, medio e interno. Las ondas sonoras viajan a través del oído externo, impactan sobre la membrana timpánica y llevan a la vibración de la cadena de huesos en el oído medio y, finalmente, esta vibración se transduce como cambios de presión en los fluidos presentes en el oído interno B, esquema de una sección transversal de la cóclea. C, gráfico que muestra las estructuras sensoriales del órgano de Corti y su correspondiente innervación. Este órgano contiene dos tipos de células mecanosensoriales: las CCIs y las CCEs que son las encargadas de convertir los estímulos mecánicos en variaciones en el potencial de membrana. Esquema adaptado de Frolenkov *et al.* (2004).

de esta manera, un movimiento ondular de la membrana basilar (Dallos, 1996). Debido al hecho de que esta membrana basilar posee una morfología y unas propiedades mecánicas particulares, la región donde se genera dicha vibración depende de la frecuencia del estímulo auditivo. Entonces, aquellos estímulos sonoros de baja frecuencia (~20 Hz en los humanos) son decodificados en la región apical, mientras que estímulos de alta frecuencia (~20 kHz en los humanos) provocan el movimiento de la región basal (*Figura 2*). Este movimiento de la membrana basilar induce consecuentemente el movimiento de los estereocilios de las células sensoriales presentes en el órgano de Corti (Hudspeth, 1985).



*Figura 2: Distribución de frecuencias a lo largo de la membrana basilar de la cóclea de humanos.* En la base de la cóclea están representadas las frecuencias altas (20 kHz), mientras que en la parte apical están representadas las bajas (20 Hz). En el gráfico también se puede observar el ensanchamiento progresivo de la membrana basilar desde la base hasta el ápex.

Las células ciliadas de los mamíferos se dividen anatómicamente en una fila de células ciliadas internas (CCIs) y tres filas de células ciliadas externas (CCEs) (*Figura 1C*). Las CCIs son los fonoreceptores propiamente dichos, que actúan como transductores de los estímulos auditivos. Estas células están en contacto con los terminales aferentes que forman el nervio auditivo (*Figuras 1C y 3*). La vibración de la membrana basilar generada por los estímulos auditivos, provoca el movimiento de los estereocilios de las CCIs, los cuales están inmersos en la endolinfa. Este movimiento produce la apertura de receptores sensibles al estiramiento, que se encuentran presentes en los cilios de estas células. Estos mecanoreceptores son canales catiónicos no selectivos (Corey y Hudspeth, 1979; Ohmori, 1985). Por lo tanto, cuando se activan, se produce una entrada de cationes que llevan a una despolarización de la célula. Como se muestra en el gráfico de la *Figura*

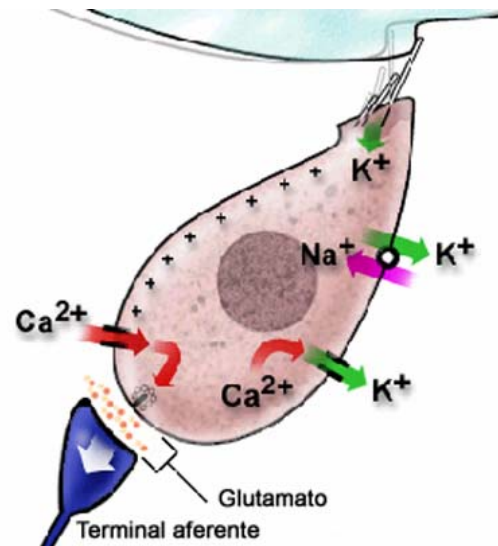
3, esta despolarización activa canales de calcio dependientes del voltaje, provocándose así la liberación del neurotransmisor, en este caso glutamato, desde la base de las CCIs con la consecuente estimulación de los terminales aferentes del nervio auditivo (Gillespie, 1995). Los cuerpos de estas neuronas aferentes se encuentran en el ganglio espiral, dentro del modiollo y sus axones forman la división coclear del nervio vestibulococlear. De esta manera, se transducen los estímulos auditivos en señales eléctricas, que son luego transmitidas hacia el sistema nervioso central.

Por otro lado, las CCEs están implicadas en la amplificación mecánica del sonido y en la sintonización fina del movimiento de la membrana basilar (Ashmore, 1987). Estas células son electromóviles, esto es, tienen la capacidad de cambiar su longitud celular en respuesta a cambios en el potencial de membrana (Brownell, 1984; Brownell *et al.*, 1985). La electromotilidad se produce debido a que las CCEs expresan en su membrana basolateral una proteína que se denomina prestina, cuya conformación cambia con el potencial de la membrana, produciéndose así cambios en la longitud celular (Zheng *et al.*, 2000). La vibración de la membrana basilar produce también el movimiento de los cilios de las CCEs, inmersos en la endolinfa y en contacto con la membrana tectorial. Esto produce la activación de los mecanorreceptores presentes en los cilios y la consecuente inducción de cambios en el potencial de membrana y motilidad de las CCEs. Esta electromotilidad modifica en forma recíproca las propiedades mecánicas de la membrana basilar de manera frecuencia-selectiva (Weiss, 1982; Holley, 1996). El descubrimiento de la motilidad de las CCEs ha producido un gran avance en el conocimiento de la función coclear. En este sentido, hoy sabemos que la cóclea no se comporta como un analizador de frecuencias simple sino como un filtro no lineal activo, permitiendo sólo la transducción de las características relevantes de los estímulos sonoros.

#### *Patrón de inervación de las células ciliadas de la cóclea de mamíferos adultos.*

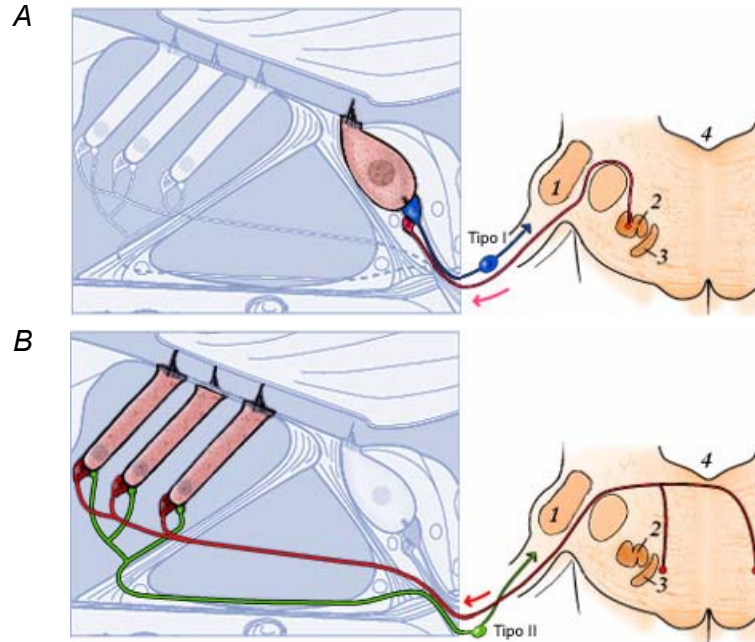
Las células ciliadas de la cóclea de mamíferos adultos están inervadas por cuatro tipos de neuronas (Pujol *et al.*, 1998): las aferentes de tipo I y II y las eferentes mediales y laterales. Como se muestra en la *Figura 4A*, las CCIs están principalmente inervadas





**Figura 3: Esquema de la transducción del estímulo mecánico en una señal eléctrica por una CCI.** Los estímulos auditivos provocan un cambio de presión en los fluidos cocleares que llevan al movimiento de los cilios de las CCIs. Este movimiento produce la apertura de los mecanorreceptores y la despolarización de la célula. Esta despolarización activa canales de calcio dependientes del voltaje, provocando así la liberación de glutamato con la consecuente estimulación de los terminales aferentes del nervio auditivo. Esquema adaptado de la página web: <http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric/audition>.

por las neuronas aferentes radiales de tipo I. Las mismas representan cerca del 95 % de la población de neuronas del ganglio espiral (Pujol *et al.*, 1998). Las neuronas eferentes laterales que provienen de la oliva superior, brindan una regulación post-sináptica a las dendritas aferentes radiales en la base de las CCIs. El sistema olivococlear es la vía final común de neuronas que se originan en el sistema nervioso central y que se dirigen a la cóclea. Este sistema se compone de una serie de núcleos diferentes de los cuales los núcleos lateral y medial superior son los más prominentes. El sistema olivococlear medial proyecta hacia la región de las CCEs y hace contactos sinápticos en la base de las mismas (Liberman, 1980; Guinan *et al.*, 1983). Además, las CCEs están conectadas a la corteza cerebral auditiva vía las neuronas aferentes espirales de tipo II (*Figura 4B*). Estas neuronas no mielinizadas representan el 5 % de la población de células del ganglio espiral (Pujol *et al.*, 1998).



**Figura 4: Patrón de inervación de las células ciliadas de mamíferos adultos.** *A*, gráfico que muestra la inervación de las CCIs. Estas células están inervadas por las neuronas aferentes de tipo I que van hacia el núcleo coclear (azul). El sistema eferente lateral (rosa), que se origina en la oliva superior lateral, controla la sinapsis CCI-neurona aferente. *B*, gráfico que muestra la inervación de las CCEs. Las CCEs hacen sinapsis con unos pocos terminales aferentes de tipo II, que forman el sistema aferente espiral (verde). Las neuronas del sistema eferente medial (rojo), a partir de ambos lados del complejo de la oliva superior medial, hacen contactos axosomáticos con las CCEs. 1- Núcleo coclear, 2- Oliva superior lateral, 3- Oliva superior medial y 4- Cuarto ventrículo. Esquema adaptado de la página web: <http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric/audition>.

*La función de las CCEs se encuentra bajo influencia del sistema nervioso central.*

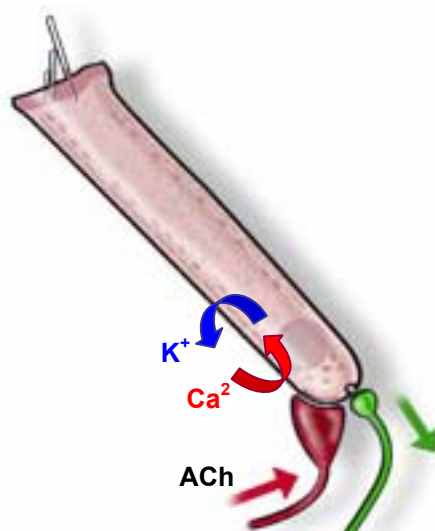
Si bien las CCEs modifican la mecánica de la cóclea sin intervención del sistema nervioso central, estas células reciben una inervación eferente olivococlear que es colinérgica (Guinan *et al.*, 1983). La función de esta inervación eferente a las CCEs es aún hoy materia de debate. Por un lado, la actividad de las fibras eferentes controla el estado mecánico de la cóclea y reduce la sensibilidad y la sintonización de las fibras aferentes auditivas (Wiederhold y Kiang, 1970; Rajan, 1990). Además, se propone que favorecería la detección de la señal auditiva de interés en ambientes ruidosos que pueden enmascarar la respuesta al estímulo auditivo (Nieder y Nieder, 1970). Más aún, el sistema eferente estaría involucrado en la protección del oído interno ante el trauma acústico (Zheng *et al.*, 1997). Por otro lado, este sistema se activaría de manera tal de reducir la

respuesta coclear al estímulo auditivo durante la ejecución de tareas que requieren una concentración focalizada en otros sentidos (Oatman, 1976). La gran importancia de las CCEs y la modulación de su actividad por el sistema eferente colinérgico en la fisiología auditiva se ve reflejada en el hecho de que la interrupción de la interacción entre la membrana basilar y las CCEs, debido al daño de estas células, es una de las causas más frecuentes de sordera de origen neurosensorial en humanos (Patuzzi *et al.*, 1989).

La acetilcolina (ACh) es el principal neurotransmisor liberado de los terminales eferentes olivococleares mediales (Eybalin, 1993) (*Figura 5*). El modelo actual de acción de la ACh sobre las células ciliadas cocleares supone una secuencia de eventos que determinan la atenuación de la actividad de las fibras aferentes del nervio auditivo. Estos incluyen una despolarización transitoria de la membrana de las CCEs y entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de la ACh, seguida de la activación de canales de  $\text{K}^+$  de baja conductancia sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  (canales de tipo SK2) con la consecuente hiperpolarización de las CCEs (Housley y Ashmore, 1991; Fuchs y Murrow, 1992a, b; Doi y Ohmori, 1993; Blanchet *et al.*, 1996; Dulon y Lenoir, 1996; Evans, 1996; Fuchs, 1996; Nenov *et al.*, 1996b; Dulon *et al.*, 1998; Yuhas y Fuchs, 1999; Oliver *et al.*, 2000). Hay además evidencias que sugieren que los depósitos intracelulares de calcio participarían en esta respuesta inhibitoria (Lioudyno *et al.*, 2004).

#### *Estructura primaria del receptor colinérgico de las CCEs.*

La estructura primaria del receptor colinérgico presente en las CCEs permaneció desconocida durante aproximadamente veinte años. Como ya se ha descrito, la aplicación de la ACh en las células ciliadas aisladas genera una respuesta hiperpolarizante debido a la activación de una corriente de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (*Figura 5*). Se propuso entonces, que este receptor colinérgico podría pertenecer tanto a la familia de canales iónicos activados por ligando, como a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Fuchs y Murrow, 1992b; Kakehata *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1996). Sin embargo, debido a que este receptor presenta características farmacológicas y electrofisiológicas atípicas, no se lo había podido clasificar como nicotínico o muscarínico. El receptor nativo presente en las CCEs es activado no sólo por la ACh, sino también por el agonista



**Figura 5: Inervación eferente olivococlear medial a las CCEs.** La sinapsis entre las fibras eferentes y las CCEs es colinérgica e inhibitoria. La ACh liberada de los terminales eferentes activa un nAChR a través del cual entra  $\text{Ca}^{2+}$  y activa un canal de  $\text{K}^{+}$  sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  que lleva a la hiperpolarización de la célula. Esquema adaptado de la página web: <http://www.iurc.montp.inserm.fr/cric/audition>.

colinérgico carbacol, el agonista nicotínico DMPP y el agonista muscarínico oxotremorina-M. Por otro lado, el agonista colinérgico clásico nicotina no es capaz de generar respuestas. Más aún, este compuesto antagoniza las respuestas inducidas por la aplicación de la ACh. Sumado a este perfil farmacológico peculiar, este receptor es bloqueado por antagonistas nicotínicos tales como la *d*-tubocurarina y la  $\alpha$ -bungarotoxina, antagonistas muscarínicos como la atropina, antagonistas glicinérgicos como la estricnina y gabaérgicos como la bicuculina. Esta farmacología atípica llevó a postular que el receptor colinérgico presente en las CCEs era de un subtipo desconocido, no clonado hasta ese momento (Fuchs y Murrow, 1992a; Erostequi *et al.*, 1994a).

Con el clonado de la subunidad nicotínica  $\alpha 9$ , se logró descifrar la naturaleza molecular del receptor colinérgico nativo de las CCEs (Elgoyhen *et al.*, 1994). El análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína codificada por  $\alpha 9$  reveló que esta subunidad pertenece a la familia de canales iónicos activados por ligando con ‘asa de cisteína’, que incluye a los receptores nicotínicos, de ácido  $\gamma$ -amino-butírico tipo A ( $\text{GABA}_A$ ) y tipo C ( $\text{GABA}_C$ ), glicina, serotonina tipo 3 ( $5\text{HT}_3$ ) y también algunos de invertebrados. Esta

secuencia presenta una mayor homología con las subunidades de receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) clonadas hasta el presente: cuatro regiones hidrofóbicas transmembranales (M1-M4), y residuos de cisteína en las posiciones 133, 147, 197, 198 (numeración para  $\alpha 9$ ). Por este motivo, a esta subunidad se la denominó  $\alpha 9$ , siguiendo con la nomenclatura vigente. La identidad de secuencia entre esta subunidad y el resto de los miembros de la familia de nAChRs es menor al 39%, lo cual sugiere que la subunidad  $\alpha 9$  es un miembro distante de la familia de los nAChRs (Elgoyhen *et al.*, 1994).

Estudios de hibridización *in situ* y de RT-PCR mostraron que la subunidad nicotínica  $\alpha 9$  tiene un patrón de expresión característico. Esta subunidad se expresa en las células ciliadas de la cóclea y en las células ciliadas del sistema vestibular (Elgoyhen *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1998a). También se reportó la expresión de  $\alpha 9$  en la *pars tuberalis* de la pituitaria, el epitelio olfatorio, la lengua (Elgoyhen *et al.*, 1994), linfocitos (Peng *et al.*, 2004), células de la médula ósea, condrocitos, osteoblastos (Luo *et al.*, 1998a), queratinocitos de la piel (Grando, 2000; Nguyen *et al.*, 2000) y espermatozoides humanos (Kumar y Meizel, 2005), lo que estaría mostrando una posible función del receptor  $\alpha 9$  distinta a su participación en la audición y el equilibrio. La expresión de la subunidad  $\alpha 9$  en oocitos de *Xenopus laevis*, reveló la formación de canales homoméricos catiónicos activables por la ACh. Este canal presenta una farmacología muy peculiar, similar a la del receptor nativo de las CCEs, que lo diferencia del resto de los nAChRs y que hace difícil su clasificación farmacológica (Elgoyhen *et al.*, 1994; Rothlin *et al.*, 1999; Verbitsky *et al.*, 2000). Otras características importantes del receptor recombinante homomérico  $\alpha 9$  son: su alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , la ausencia de desensibilización ante la aplicación prologada o intermitente de una concentración saturante del agonista y el bloqueo dependiente del voltaje de las corrientes colinérgicas a concentraciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ . A partir de estos estudios, se postuló que la subunidad nicotínica  $\alpha 9$  es un componente estructural fundamental del receptor colinérgico presente en la base de las CCEs (Elgoyhen *et al.*, 1994). La función clave que tiene esta subunidad  $\alpha 9$  en la sinapsis olivococlear fue confirmada, además, mediante la generación de un ratón mutante nulo para el gen que codifica para la subunidad  $\alpha 9$ , *Acra9* (Vetter *et al.*, 1999). Como ha sido descrito anteriormente, la activación del sistema eferente olivococlear disminuye la

sensibilidad de la cóclea. Estos ratones *knock-out*, carentes de la subunidad  $\alpha 9$ , resultan funcionalmente desferentados dado que no son capaces de suprimir las respuestas cocleares al estimular las fibras eferentes. Esto demuestra que la subunidad  $\alpha 9$  juega un papel fundamental en mediar el único efecto claramente descrito para el sistema eferente olivococlear. Más aún, las CCEs de los ratones *knock-out* están inervadas por un único gran terminal sináptico, a diferencia de las CCEs de los ratones salvajes que están inervadas por múltiples y pequeños terminales. Esta diferencia revela la participación de la subunidad  $\alpha 9$  en el desarrollo y en el establecimiento de los contactos sinápticos normales entre las fibras eferentes y las células ciliadas (Vetter *et al.*, 1999).

A pesar de la similitud farmacológica descrita, existían en la bibliografía algunos indicios que indicaban que las propiedades del receptor nativo de las CCEs de la cóclea diferían con respecto a lo observado para el receptor recombinante homomérico  $\alpha 9$ : (1) las respuestas del receptor nativo producidas por la ACh se desensibilizan ante la aplicación del agonista (Blanchet *et al.*, 1996; Dulong y Lenoir, 1996), (2) el  $\text{Ca}^{2+}$  potencia las corrientes activadas por la ACh en el receptor nativo del cobayo (Blanchet *et al.*, 1996; Evans, 1996) o ejerce una modulación bifásica, potenciación y bloqueo, sobre el receptor nativo de pollo (McNiven *et al.*, 1996) y (3) las conductancias del receptor nativo son mayores a potenciales de membrana hiperpolarizados (Dulong y Lenoir, 1996). Aún cuando estas discrepancias podrían deberse a alguna modificación post-traduccional diferencial entre el sistema heterólogo y el nativo, también podrían derivar de la posibilidad de que el receptor nativo estuviese compuesto por alguna otra subunidad además de  $\alpha 9$ .

El clonado de la subunidad nicotínica  $\alpha 10$  a partir de una biblioteca de ADNc de cóclea (Elgoyhen *et al.*, 2001), dio lugar a un nuevo desafío en la elucidación de la estructura del receptor presente en las células ciliadas. Esta nueva subunidad tiene un 36% de identidad de secuencia con las subunidades nicotínicas  $\alpha$  hasta entonces conocidas y una mayor homología con la subunidad  $\alpha 9$  (57%) (Elgoyhen *et al.*, 2001). La proteína  $\alpha 10$  se expresa en los órganos sensoriales de la cóclea y del sistema vestibular (Elgoyhen *et al.*, 2001), en queratinocitos (Sgard *et al.*, 2002) y en linfocitos (Peng *et al.*, 2004). La inyección de oocitos de *Xenopus laevis* con el ARNc de la subunidad  $\alpha 10$  sólo

o en combinación con las subunidades nicotínicas  $\alpha 2$ - $\alpha 6$  o  $\beta 2$ - $\beta 4$  no resulta en la formación de canales activables por la ACh. Sin embargo, la expresión conjunta de  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  resulta en la formación de receptores heteroméricos cuyas respuestas a la aplicación de ACh son dos órdenes de magnitud más grandes que las obtenidas con el receptor recombinante homomérico  $\alpha 9$  (Elgoyhen *et al.*, 2001). A diferencia de lo observado para el receptor recombinante homomérico  $\alpha 9$ , el receptor recombinante heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  se desensibiliza durante la aplicación continua o intermitente del agonista, las respuestas evocadas por la ACh son moduladas por el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de manera bifásica (a concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, 0.2 mM, se observa un efecto potenciador, mientras que a mayores concentraciones se evidencia un efecto bloqueante) y la relación de corriente en función del voltaje ( $I-V$ ) no presenta rectificación entrante (Elgoyhen *et al.*, 2001; Weisstaub *et al.*, 2002). Aunque la presencia de la subunidad  $\alpha 10$  introduce algunas diferencias en las características biofísicas del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  con respecto a lo observado para el nAChR homomérico  $\alpha 9$ , ambos receptores exhiben un perfil farmacológico muy similar, casi idéntico al descrito para el receptor colinérgico nativo presente en las CCEs de la cóclea (Elgoyhen *et al.*, 2001). La similitud de las propiedades farmacológicas y biofísicas del receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  con las del receptor nativo de las CCEs, han llevado a sugerir que ambas subunidades forman parte del receptor colinérgico que se encuentra presente en la sinapsis entre las fibras eferentes olivococleares y las CCEs (Elgoyhen *et al.*, 2001; Weisstaub *et al.*, 2002).

#### *Importancia del receptor colinérgico durante el desarrollo de las CCI.*

Como mencionamos anteriormente, en la cóclea madura, las CCI transducen los estímulos sonoros y se comunican con el sistema nervioso central mediante las dendritas aferentes. Se considera que la inervación eferente directa a las CCI maduras es mínima o nula. Sin embargo, al momento del nacimiento las fibras olivococleares mediales, hacen contactos axosomáticos con las CCI, antes de inervar finalmente a las CCEs (Pujol *et al.*, 1998) (*Figura 6*). Esta inervación es transitoria y desaparece al comienzo de la audición, que en ratas y ratones es a partir del día 12-13 postnatal (P12-P13). Estos contactos transitorios fueron descritos en varias especies: ratas (Lenoir *et al.*, 1980), gatos

(Ginzberg y Morest, 1984), hamsters (Simmons *et al.*, 1996b; Simmons *et al.*, 1998) y ratones (Emmerling *et al.*, 1990; Sobkowicz y Slapnick, 1994). Las CCIIs expresan el ARN mensajero que codifica para la subunidad  $\alpha 9$  desde el estadio embrionario 18 (E18) hasta el adulto (Elgoyhen *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1998a; Simmons y Morley, 1998), pero expresan el ARN mensajero que codifica para la subunidad  $\alpha 10$  sólo desde E21 hasta P15 (Elgoyhen *et al.*, 2001; Morley y Simmons, 2002), período en que las fibras eferentes olivococleares hacen contactos axosómicos con las CCIIs. Al comienzo de la audición, la mayoría de los terminales eferentes cambian su trayectoria y atraviesan el túnel de Corti para inervar la base de las CCEs, aunque algunos terminales eferentes sobre las CCIIs persisten en el adulto (Vetter *et al.*, 1999).

Glowatzki y Fuchs (2000), utilizando explantos de cóclea de rata, demostraron la presencia de corrientes sinápticas y de corrientes producidas por la aplicación de la ACh en las CCIIs previo al comienzo de la audición. Estos autores observaron que estas respuestas eran inhibitorias y que estaban mediadas por un receptor activado por la ACh y por la apertura subsiguiente de un canal de  $K^+$  sensible al  $Ca^{2+}$  del tipo SK2 (*Figura 6*). Las CCIIs inmaduras son capaces de generar potenciales de acción repetitivos y espontáneos (Kros *et al.*, 1998). Estos potenciales de acción están mediados por canales de  $Ca^{2+}$  y desaparecen al comienzo de la audición debido a la expresión de canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de conductancia grande (canales de tipo BK) (Kros *et al.*, 1998). Se ha demostrado que esta actividad eléctrica de las CCIIs inmaduras es capaz de provocar la liberación del neurotransmisor (glutamato) en la sinapsis aferente (Beutner y Moser, 2001) (*Figura 6*). La aplicación de la ACh en las CCIIs de la preparación aguda del órgano de Corti, antes del comienzo de la audición, produce una reducción en la frecuencia de los potenciales de acción espontáneos (Glowatzki y Fuchs, 2000). Esto indicaría que la inervación eferente estaría modulando la actividad eléctrica de las CCIIs y, consecuentemente, la liberación de neurotransmisor en la sinapsis aferente.

Las neuronas inmaduras del nervio auditivo disparan potenciales de acción con un patrón rítmico, tanto espontáneamente (Lippe, 1994), como en respuesta al sonido (Sanes y Walsh, 1998). Se observó que el patrón de disparo rítmico de estas neuronas inmaduras se vuelve continuo luego de cortar los terminales eferentes (Walsh *et al.*, 1998), lo que sugiere que la inhibición colinérgica a las CCIIs estaría imponiendo el patrón de disparo

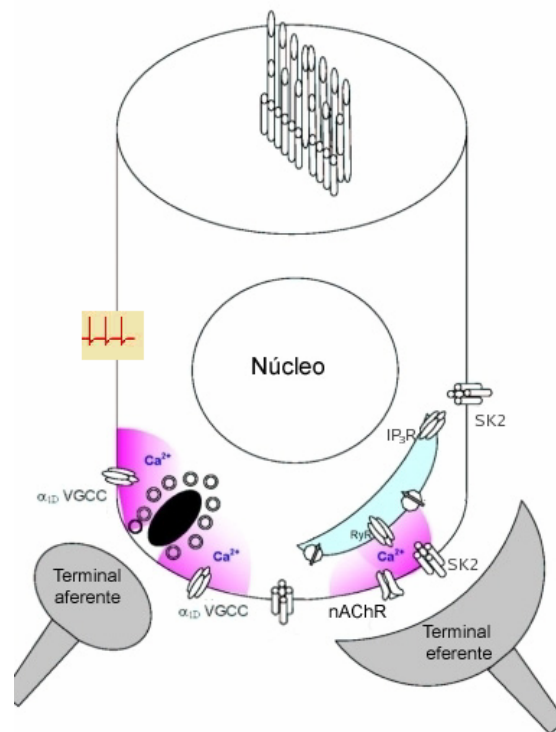


rítmico del nervio auditivo inmaduro. Un disparo coordinado de las fibras aferentes podría influir en la diferenciación sináptica, como se ha sugerido para las conexiones retinogeniculadas en las vías visuales (Cabelli *et al.*, 1995). Por otro lado, Puel y colaboradores (1995) han demostrado que la sinapsis axosomática a las CCIs vuelve a aparecer en el adulto de una manera transitoria luego de que estas células hayan sido desconectadas de las dendritas aferentes auditivas mediante daño por excitotoxicidad.

Si bien no está claro aún cual es la función de la sinapsis eferente transitoria a las CCIs, todas estas observaciones mencionadas anteriormente llevan a proponer que estaría involucrada en la maduración y el establecimiento de las vías auditivas durante el desarrollo. La inhibición colinérgica a las CCIs podría ser importante para la maduración de las neuronas aferentes inmaduras (Eatock y Hurley, 2003); (Glowatzki y Fuchs, 2000; Fuchs, 2006). Además de estimular la actividad del nervio auditivo, la actividad de las CCIs inmaduras podría llevar a la liberación de factores neurotróficos esenciales para el mantenimiento de las neuronas del ganglio espiral (Erkman *et al.*, 1996; Knipper *et al.*, 1997).

La actividad eléctrica de las CCIs parece ser también importante para la diferenciación y mantenimiento de ellas mismas. Trenes de potenciales de acción causan oscilaciones en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Beutner y Moser, 2001). Estos cambios en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pueden regular varias funciones celulares como cambios en la expresión génica (Gu y Spitzer, 1995; Dolmetsch *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998). Durante el desarrollo, ocurren varios cambios significativos en las CCIs, ya que las mismas comienzan a transmitir continuamente hacia el sistema nervioso central y esto se caracteriza por modificaciones en la expresión de varios canales iónicos y proteínas sinápticas. Antes del comienzo de la audición, las CCIs expresan canales mecanotransductores funcionales, canales de  $\text{K}^+$  dependientes del voltaje de activación lenta y rectificación saliente, canales de  $\text{K}^+$  rectificadores entrantes y canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  dependientes del voltaje (Kros *et al.*, 1998; Marcotti *et al.*, 1999; Beutner y Moser, 2001; Marcotti *et al.*, 2003a, b). Los canales de  $\text{K}^+$  de activación lenta y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{Na}^+$  son los que participan en la generación de los potenciales de acción en estas células (Kros y Crawford, 1990; Marcotti *et al.*, 2003a). Con la maduración, varios cambios tienden a reducir la actividad eléctrica de las CCIs. En particular, disminuye la

expresión de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{Na}^{+}$  dependientes del voltaje (Beutner y Moser, 2001; Marcotti *et al.*, 2003a), y aparece una corriente de  $\text{K}^{+}$  de activación rápida y de gran conductancia que fluye a través de canales de  $\text{K}^{+}$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo BK (Kros *et al.*, 1998; Marcotti *et al.*, 2003b). La expresión de este canal de  $\text{K}^{+}$  de conductancia grande al comienzo de la audición lleva a hiperpolarizar aún más a las CCIs impidiendo que se alcance el umbral para la generación de los potenciales de acción. Además, la activación rápida de este canal lleva a una disminución en la constante de tiempo de la membrana de las CCIs (Kros *et al.*, 1998). Esta disminución en la constante de tiempo de la membrana se requiere para que las fibras aferentes que contactan a las CCIs sean capaces de preservar la periodicidad de un estímulo auditivo en su patrón de disparo hasta varios kilohertz. Todos estos cambios en la expresión de distintos canales iónicos se producen en paralelo a la transformación de un epitelio sensorial en desarrollo, a uno maduro.



**Figura 6: Inervación eferente transitoria a las CCIs inmaduras.** Durante el desarrollo postnatal, antes del comienzo de la audición, las fibras eferentes mediales provenientes de la oliva superior, hacen contactos axosomáticos transitorios con las CCIs. Esta sinapsis es inhibitoria y está mediada por un nAChR a través del cual entra  $\text{Ca}^{2+}$ . El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  activaría canales de  $\text{K}^{+}$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que llevan a la hiperpolarización de la célula (Glowatzki y Fuchs, 2000). Además, las CCIs inmaduras presentan potenciales de acción de  $\text{Ca}^{2+}$  que causan la liberación de neurotransmisor en la sinapsis aferente (Beutner y Moser, 2001).  $\alpha_{1D}$  VGCC: canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes del voltaje. Esquema modificado de Fuchs (2006).

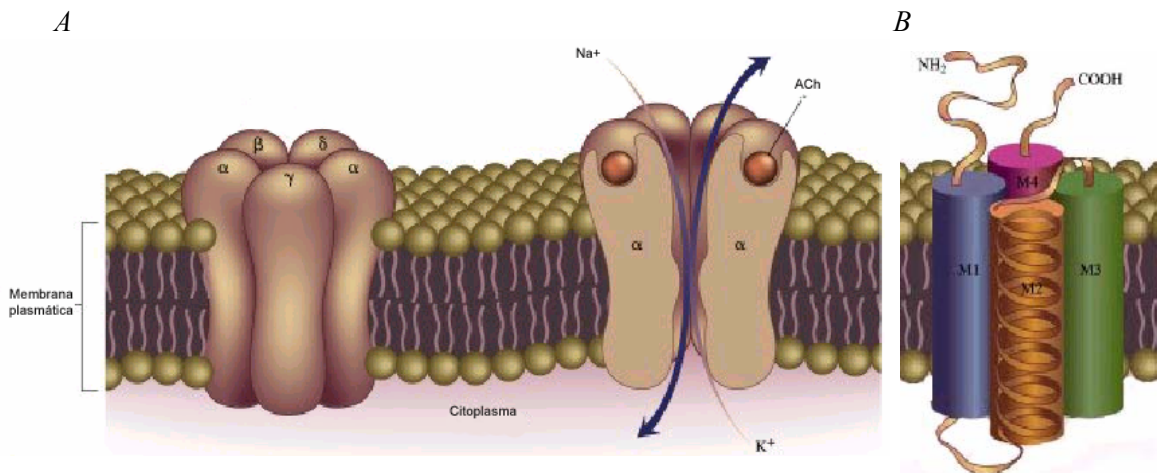
*Receptores colinérgicos.*

Los receptores colinérgicos se clasifican, en base a sus propiedades farmacológicas, en nicotínicos y muscarínicos (Dale, 1914; Taylor, 1990). Dichos receptores difieren en su estructura molecular y forman parte de dos familias génicas distintas. Los receptores muscarínicos, también llamados receptores colinérgicos metabotrópicos, pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores están formados por una única cadena polipeptídica con siete pasos transmembranales (Hosey, 1992). Se encuentran principalmente en células efectoras de la división autonómica del sistema nervioso periférico, ganglios y cerebro. Los receptores nicotínicos (nAChRs), también llamados receptores colinérgicos ionotrópicos, pertenecen a la gran familia de canales iónicos activados por ligando, que también incluye a los receptores de glicina, de GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub>, de serotonina tipo 3 (5HT<sub>3</sub>) y también algunos de invertebrados (Karlin, 2002). Los receptores nicotínicos se encuentran tanto en la placa neuromuscular como en el sistema nervioso central y periférico de los mamíferos. En la placa neuromuscular y en el sistema nervioso autónomo median la transmisión colinérgica excitatoria rápida a nivel sináptico. Mientras que a nivel central, estos receptores tienen localización principalmente pre-sináptica modulando la liberación de otros neurotransmisores (Jones, 1999).

*Los receptores colinérgicos nicotínicos.*

Los nAChRs fueron caracterizados en un principio por su capacidad de ser activados por la nicotina. La activación de estos receptores por la ACh lleva a una rápida entrada de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> con la consecuente despolarización celular. Los nAChRs son complejos proteicos compuestos por cinco subunidades dispuestas de forma tal que generan un poro que atraviesa la membrana plasmática (*Figura 7A*). Cada una de estas subunidades son similares en su secuencia aminoacídica y en su topología: cada subunidad presenta un gran dominio amino terminal extracelular seguido por cuatro segmentos transmembranales (M1-M4), con un dominio intracelular formado por una larga porción de secuencia que conecta los segmentos M3 y M4, y un pequeño dominio carboxilo terminal extracelular (Karlin, 1993) (*Figura 7B*). A partir de estudios de afinidad se pudo deducir la posición de los distintos segmentos transmembranales con

respecto al ambiente lipídico de la membrana que rodea al receptor. Todos los dominios M4 miran hacia los lípidos, al igual que los dominios M1 y M3 (Hucho *et al.*, 1986). Por otro lado, ninguno de los dominios M2 de las distintas subunidades se encuentra en contacto con los lípidos y se postula que los mismos conformarían la pared del poro del canal. Estos segmentos M2 han sido evidenciados como anillos de cinco densidades con forma cilíndrica, consistentes con una conformación  $\alpha$ -hélice (Figura 7B). Estas características estructurales son compartidas con subunidades que forman otros canales iónicos activados por ligando y con las que constituyen una superfamilia denominada receptores con ‘asa de cisteínas’, ya que contienen en el extremo amino terminal dos cisteínas, separadas por 13 aminoácidos, unidas por un puente disulfuro. Todos los miembros de esta superfamilia funcionan como canales iónicos, catiónico o aniónico, mediando la transmisión sináptica excitatoria o inhibitoria. En mamíferos, los miembros de esta superfamilia que son selectivos para cationes incluyen a los nAChRs y serotoninérgicos de tipo 3, mientras que los que son selectivos para aniones incluyen a los receptores de GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub> y glicinérgicos. En invertebrados, también existen canales iónicos miembros de esta superfamilia: estos canales son activados por glutamato, serotonina, histidina y ACh (Raymond y Sattelle, 2002).



**Figura 7: Esquema del receptor nicotínico muscular.** A, el nAChR es un canal catiónico no selectivo que esta formado por cinco subunidades dispuestas de forma tal que generan un poro que atraviesa la membrana plasmática. Dos subunidades  $\alpha$  y una de cada una de las otras subunidades, ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , o  $\epsilon$ ) conforman el receptor pentamérico. La apertura del canal ocurre tras la unión de la ACh a las dos subunidades  $\alpha$  en sitios cercanos o en las interfases con las subunidades  $\delta$  y  $\gamma$  vecinas. B, diagrama de la topología de una subunidad nicotínica. Cada subunidad está compuesta por 4 segmentos transmembranales (M1-M4). El segmento M2 es el que forma la pared del poro del canal.

*Diversidad de receptores nicotínicos.*

Los receptores nicotínicos son tradicionalmente clasificados en neuronales y musculares. Los musculares median la transmisión neuro-muscular mientras que los neuronales se expresan tanto en las neuronas postganglionares del sistema nervioso autónomo como en el sistema nervioso central, donde juegan un papel clave en la neurotransmisión, en forma directa, mediando la transmisión sináptica excitatoria rápida o en forma indirecta, modulando la liberación de otros neurotransmisores (Jones, 1999).

Los receptores musculares se encuentran formados por cinco tipos de subunidades codificadas por distintos genes,  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (*Tabla 1* y *Figura 7*). Los receptores presentes en el tejido muscular adulto presentan una composición  $\alpha 2\beta\epsilon\delta$ , mientras que en el estadio embrionario, el músculo expresa un receptor de composición  $\alpha 2\beta\gamma\delta$ . Las propiedades e interacciones entre subunidades han sido estudiadas exhaustivamente por técnicas bioquímicas, electrofisiológicas y de biología molecular (Corringer *et al.*, 2000; Karlin, 2002). La apertura del canal ocurre tras la unión de la ACh a las dos subunidades  $\alpha$  en sitios cercanos o en las interfases con las subunidades  $\delta$  y  $\gamma$  vecinas (Karlin, 1993). Estos sitios están formados por tres regiones de la cadena polipeptídica y que incluyen al denominado ‘asa de cisteínas’ (Corringer *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos por microscopía electrónica (Unwin, 1993), muestran que sólo el 33 % del receptor se encuentra inmerso en la membrana mientras que alrededor del 50 % es extracelular.

Los receptores neuronales, por otro lado, se encuentran codificados por una gran variedad de genes que incluyen siete subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 2$  a  $\alpha 8$ ) y tres subunidades  $\beta$  ( $\beta 2$  a  $\beta 4$ ) (*Tabla 1*). Si bien numerosos autores colocan las subunidades recientemente clonadas  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  dentro del tipo de receptores neuronales, estas subunidades parecerían sólo expresarse en células epiteliales, como en los órganos sensoriales de la cóclea y del sistema vestibular (Elgoyhen *et al.*, 2001) y en queratinocitos (Sgard *et al.*, 2002). Esto, sumado a las evidencias farmacológicas ante mencionadas, indica que las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  conforman un nuevo tipo de receptores (*Tabla 1*). No todas las combinaciones de subunidades dan origen a receptores funcionales. Las reglas de ensamblado han sido estudiadas mediante expresión en sistemas heterólogos, para así determinar qué combinaciones resultan en receptores funcionales. Sólo las subunidades  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  y  $\alpha 9$

pueden formar receptores homoméricos.  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  y  $\alpha 6$  forman receptores funcionales sólo si son coexpresadas con subunidades  $\beta 2$  y  $\beta 4$  formando receptores de estequiometría  $(\alpha)_2(\beta)_3$  (Anand *et al.*, 1991; Cooper *et al.*, 1991; Boorman *et al.*, 2000), mientras que  $\alpha 5$  y  $\beta 3$  sólo forman receptores funcionales si son expresados en forma conjunta con otras subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Ramirez-Latorre *et al.*, 1996; Boorman *et al.*, 2000; Groot-Kormelink *et al.*, 2001). Finalmente, la subunidad  $\alpha 10$  participa en la formación de nAChRs funcionales sólo si se coexpresa en conjunto con  $\alpha 9$  (Elgoyhen *et al.*, 2001; Sgard *et al.*, 2002), formando receptores de estequiometría  $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$  (Plazas *et al.*, 2005).

Estudios de hibridización *in situ* demostraron que las subunidades  $\alpha 4$  y  $\beta 2$  son las más abundantes en el sistema nervioso central, mientras que las  $\alpha 3$  y  $\beta 4$  lo son en el sistema nervioso autónomo. Otras subunidades tienen una localización más discreta:  $\alpha 6$  se concentra en núcleos catecolaminérgicos del cerebro (Le Novère *et al.*, 1996) y  $\beta 3$  se presenta en la sustancia nigra, el cuerpo estriado, el cerebelo y la retina (Forsayeth y Kobrin, 1997). Los transcritos de  $\alpha 7$  se encuentran tanto en el sistema nervioso central como periférico, mientras que  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  se encuentran confinados principalmente al oído interno, así como también en la pituitaria, piel y células linfáticas (Luo *et al.*, 1998a; Grando, 2000; Nguyen *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2004).

#### *Propiedades generales.*

La primer gran distinción funcional entre los nAChRs neuronales es en receptores homoméricos y heteroméricos. La propiedad más distintiva de los receptores homoméricos es su sensibilidad a la  $\alpha$ -bungarotoxina y a la metilcaconitina, y su alta permeabilidad al ión calcio. Los receptores heteroméricos  $\alpha/\beta$  pueden diferenciarse por sus distintas sensibilidades a agonistas y antagonistas. Por ejemplo, la citisina es más potente y eficaz en receptores que contienen la subunidad  $\beta 4$  que en los que contienen la  $\beta 3$  (Luetje y Patrick, 1991). Entre los antagonistas, la  $\alpha$ -conotoxina ( $\alpha$ -CTx) MII es específica para los nAChRs que contienen las subunidades  $\alpha 3$  y  $\beta 2$  (Cartier *et al.*, 1996), y la  $\alpha$ -CTx AuIBA es específica para los nAChRs que contienen las subunidades  $\alpha 3$  y  $\beta 4$  (Luo *et al.*, 1998b).

Subunidades musculares	Subunidades neuronales		Subunidades epiteliales
$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\beta 2$	$\alpha 9$
$\beta 1$	$\alpha 3$	$\beta 3$	$\alpha 10$
$\gamma$	$\alpha 4$	$\beta 4$	
$\delta$	$\alpha 5$		
$\varepsilon$	$\alpha 6$		
	$\alpha 7$		
	$\alpha 8$		

Tabla 1: muestra las distintas subunidades que se conocen de los nAChRs neuronales y del muscular. Las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  conforman un grupo especial dentro de la familia de nAChRs.

Las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  forman un grupo especial dentro de la familia de subunidades nicotínicas. Constituyen una subfamilia separada del resto de subunidades, que se encuentra más cercana al ancestro evolutivo del cual derivan (Le Novère *et al.*, 2002). Recientemente se ha mostrado que la subunidad  $\alpha 10$ , pero no la  $\alpha 9$ , muestra una selección positiva sólo a lo largo del linaje que conduce a mamíferos, lo que sugiere la adquisición de una nueva función para esta subunidad  $\alpha 10$ , que llevaría a la formación de nAChRs en las células ciliadas de mamíferos con características únicas (Franchini y Elgoyhen, 2006). Además, la expresión de estas subunidades en oocitos de *Xenopus laevis* resulta en la formación de nAChRs homoméricos  $\alpha 9$  y heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$ , que son activados por la ACh pero no por nicotina, agonista colinérgico típico de la familia de nAChRs. Más aún, estos receptores son bloqueados por la  $\alpha$ -bungarotoxina y la metilcaconitina (Elgoyhen *et al.*, 1994; Elgoyhen *et al.*, 2001).

#### Modulación por el $Ca^{2+}$ .

El ión calcio presenta efectos múltiples sobre los nAChRs: no sólo es un ión permeante sino que afecta la conductancia a nivel de canal único y modula la respuesta a los agonistas. Todos los nAChRs son permeables al  $Ca^{2+}$ : el nAChR muscular tiene una

permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  muy pequeña, mientras que los más permeables son los receptores  $\alpha 7$  (Sands y Barish, 1991; Bertrand *et al.*, 1993b; Castro y Albuquerque, 1995; Fucile *et al.*, 2000),  $\alpha 9$  (Katz *et al.*, 2000) y  $\alpha 9\alpha 10$  (Sgard *et al.*, 2002; Weisstaub *et al.*, 2002; Fucile *et al.*, 2006). En algunos casos la permeabilidad de los nAChRs es más elevada que la de otros canales operados por ligando como por ejemplo, el receptor de NMDA (Vernino *et al.*, 1992; Séguéla *et al.*, 1993; Burnashev, 1996). Lo que reviste importancia fisiológica es que la entrada de calcio a través de los nAChRs es suficiente como para actuar de señal post-sináptica, por ejemplo, activando canales de potasio dependientes de calcio (SK2) en las células ciliadas de la cóclea (Housley y Ashmore, 1991; Fuchs y Murrow, 1992a, b; Doi y Ohmori, 1993; Blanchet *et al.*, 1996; Dulon y Lenoir, 1996; Evans, 1996; Fuchs, 1996; Nenov *et al.*, 1996b; Dulon *et al.*, 1998; Yuhas y Fuchs, 1999; Oliver *et al.*, 2000) o contribuyendo a la hiperpolarización sensible a apamina en los ganglios óticos de rata (Callister *et al.*, 1997). Existen además evidencias de que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los nAChRs modularía la expresión de genes, el crecimiento neurítico y la muerte neuronal durante el desarrollo, mediante la activación de cascadas de segundos mensajeros (Role y Berg, 1996).

El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (en el rango milimolar bajo) modula la actividad de los nAChRs. Tanto en experimentos en los cuales las subunidades nicotínicas neuronales fueron expresadas en oocitos de *Xenopus laevis*, así como en ensayos sobre el receptor nativo, se vio que el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular produce un aumento en la amplitud de la respuesta macroscópica en presencia de la ACh (Mulle *et al.*, 1992a; Vernino *et al.*, 1992; Galzi *et al.*, 1996). Este efecto es mayor a bajas concentraciones del agonista y es independiente del potencial de membrana de la célula. Más aún, se demostró que este efecto no se debe a un aumento en el pasaje de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del poro del canal, ya que la corriente unitaria disminuye a medida que se aumenta la concentración extracelular este ión. Por lo tanto, se postula que la potenciación por el  $\text{Ca}^{2+}$  se debe a un efecto alostérico que este catión ejerce sobre un sitio extracelular del receptor (Mulle *et al.*, 1992a; Vernino *et al.*, 1992; Galzi *et al.*, 1996). Este efecto de potenciación está ausente en el nAChR muscular embrionario (Vernino *et al.*, 1992) y en el homomérico  $\alpha 9$  (Katz *et al.*, 2000). En los receptores  $\alpha 7$  nativos y recombinantes (Bonfante-Cabarcas *et al.*, 1996) y en el recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  (Weisstaub *et al.*, 2002) se observa un efecto bifásico:



potenciación de las respuestas a concentraciones submilimolares de  $\text{Ca}^{2+}$  y depresión de las respuestas a concentraciones mayores. Se propone que la reducción de las respuestas a altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular se debe a una obstrucción del flujo de cationes monovalentes, fenómeno que lleva a una disminución de la conductancia de canal único (Bregestovski *et al.*, 1979; Lewis, 1979; Mathie *et al.*, 1987; Neuhaus y Cachelin, 1990; Mulle *et al.*, 1992a; Vernino *et al.*, 1992). De esta manera, variaciones en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, como ocurre en el sistema nervioso central durante una actividad sináptica intensa, podrían modular la actividad neuronal a través de su efecto sobre los nAChRs.

## Hipótesis de Trabajo

En el presente trabajo se evaluó la hipótesis de que el receptor que media la sinapsis eferente olivococlear en las células ciliadas internas de la cóclea de mamíferos está compuesto por las subunidades nicotínicas  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ .

## Objetivos

- 1 El objetivo de la primer parte de la tesis fue realizar una caracterización biofísica y farmacológica del receptor nativo de las células ciliadas internas de la cóclea de ratas. La comparación de estos resultados con los obtenidos para los receptores recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  expresados en oocitos de *Xenopus laevis* nos permitiría obtener información sobre la composición del receptor nativo.
- 2 Durante el desarrollo postnatal y previo al comienzo de la audición, las CCI reciben una inervación eferente colinérgica transitoria. La subunidad nicotínica  $\alpha 10$  deja de expresarse en estas células luego del comienzo de la audición. El objetivo de la segunda parte del trabajo fue estudiar la ontogenia de las respuestas colinérgicas en las CCIs, para analizar si existía una correlación entre el patrón de expresión de  $\alpha 10$  y la presencia de un receptor colinérgico funcional en estas células.
- 3 El estudio de las respuestas electrofisiológicas de las CCEs de la cóclea resulta complicado por la presencia de una corriente de potasio ( $I_{K,n}$ ) que impide fijar el voltaje de estas células a potenciales hiperpolarizados. Esta corriente es bloqueada por la linopiridina y se ha utilizado esta droga cuando se estudiaron las respuestas colinérgicas de las CCEs. Debido a que el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  es bloqueado por drogas muy diversas, para analizar si la linopiridina modifica las respuestas a la ACh en las CCEs, estudiamos el efecto de la misma sobre el receptor nativo de las células ciliadas y sobre el receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  expresado en oocitos de *Xenopus laevis*.

## **Materiales y Métodos**

### **Disección del órgano de Corti y registros electrofisiológicos en las células ciliadas.**

#### *Preparación del órgano de Corti.*

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley (Charles River, Wilmington, MA) de diferentes edades postnatales. El día de nacimiento se consideró como día 0 (P0, postnatal 0). Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico y fueron decapitadas luego de comprobar que se hallaban en un estado de profunda anestesia.

Las disecciones del órgano de Corti se realizaron bajo lupa (Leica S8AP0, Wetzlar, Alemania) en ratas de edades desde P3 hasta P27. Luego de extraer la cóclea, se escindió la vuelta apical y posteriormente se removió la estría vascularis, el modiolo y la membrana tectorial. Las preparaciones se colocaron sobre un cubreobjetos con hilo de nylon para inmovilizarlas y luego se montaron en una camarita para registros electrofisiológicos bajo un microscopio Axioskope (Zeiss, Oberkochen, Alemania). El seguimiento visual de las preparaciones se realizó con contraste de interferencia diferencial (DIC) utilizando un objetivo de inmersión en agua 63X y una cámara con aumento de contraste (Hamamatsu C2400-07, Tokio, Japón). Los registros electrofisiológicos se realizaron inmediatamente luego de la disección y los mismos se prolongaron hasta un máximo de tres horas.

#### *Registros electrofisiológicos en las células ciliadas.*

Dado que las fibras eferentes olivococleares comienzan a hacer contactos sinápticos con las CCEs durante la segunda semana postnatal (Pujol *et al.*, 1998), las CCEs fueron estudiadas en explantos de cóclea de ratas de P21 a P27. La evaluación de las corrientes producidas por la ACh en las CCIIs fueron realizadas previo al comienzo de la audición (P9-P11). Para el estudio del desarrollo de las corrientes colinérgicas, se utilizaron ratas desde P3 hasta P22. Los métodos para registrar en CCIIs y CCEs fueron similares a lo previamente descrito por Glowatzki y Fuchs (2000) y por Oliver *et al.* (2000).

Las CCI's fueron identificadas primero visualmente utilizando el objetivo 63X y luego por su capacitancia (de 7 a 12 pF) y por sus corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  características y, a edades mayores, también por la presencia de corrientes de  $\text{K}^+$  de activación rápida (Kros *et al.*, 1998). Las CCEs también fueron identificadas visualmente y para los registros se escogieron las células de la primer y segunda fila. Luego de montar la preparación bajo el microscopio, se removieron algunas células de soporte que se encuentran por encima de las CCI's utilizando una pipeta de limpieza (*Figura 8*). Este paso es necesario para tener un mejor acceso a estas células. La pipeta de registro fue trasladada a través del tejido bajo presión positiva.

Los registros electrofisiológicos en las CCI's y CCEs fueron realizados mediante la técnica de *patch-clamp* en la configuración *whole-cell* utilizando un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments Corp., Union City, CA, EE.UU.). Las señales fueron filtradas a 2-10 kHz y digitalizadas a 5-20 kHz mediante una placa conversora analógico-digital Digidata 1200 (Axon Instruments Corp., Union City, CA, EE.UU.). Los registros fueron realizados a temperatura ambiente (22-25°C). Se utilizaron pipetas de vidrio de 1.2 mm de diámetro con resistencias de 7-10 M $\Omega$ , estiradas con un estirador de pipetas modelo P-30 (Sutter Instrument Co., Novato, CA, EE.UU.). Los registros en las CCI's fueron realizados a potenciales de sostén ( $V_{\text{sostén}}$ ) de -90 mV, a menos que se indique lo contrario en la sección correspondiente, mientras que los registros en las CCEs fueron realizados a un potencial de -30 mV.

### *Soluciones.*

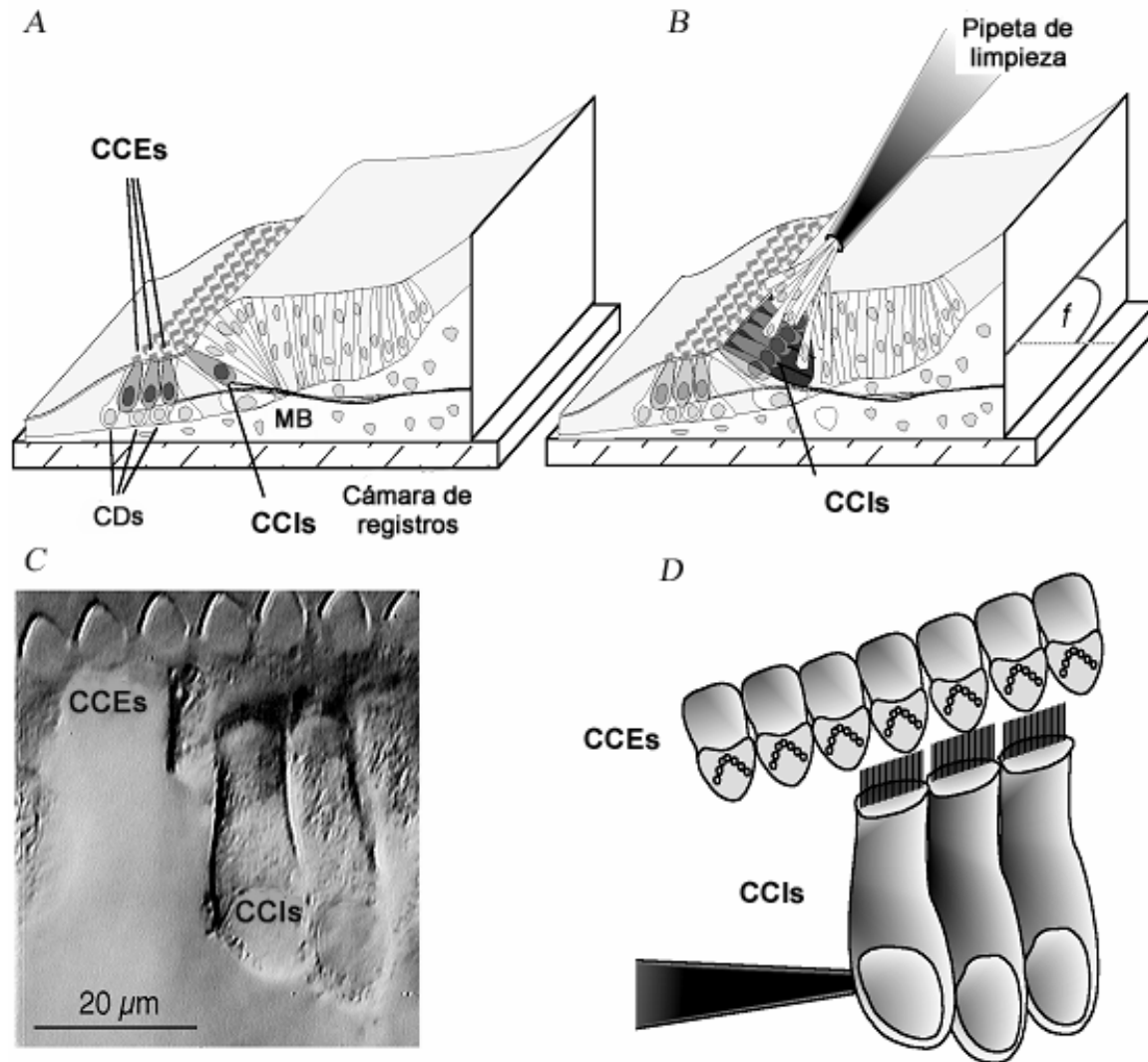
La preparación de cóclea fue continuamente bañada con una solución extracelular compuesta por (en mM): NaCl 155, KCl 5.8,  $\text{CaCl}_2$  1.3,  $\text{MgCl}_2$  0.9,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.7, D-glucosa 5.6, y HEPES 10, pH 7.4. Esta solución tiene una composición iónica similar a la de la perilinfa, solución que baña la base de las células ciliadas. En los experimentos en donde se estudió la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y la modulación de las corrientes sinápticas espontáneas por este catión; se utilizó una solución extracelular compuesta por (en mM): NaCl 100, KCl 5.8,  $\text{CaCl}_2$  1.3,  $\text{MgCl}_2$  0.9, D-glucosa 5.6 y HEPES 10, pH 7.4. La osmolaridad de esta solución se ajustó a 300-320 mosmol  $\text{kg}^{-1}$  con sacarosa ( $\sim 26 \text{ g l}^{-1}$ ).

Las soluciones de trabajo (que contenían distintas concentraciones de cationes divalentes, alto  $K^+$ , ACh y/o las distintas drogas) fueron aplicadas a través de una pipeta (con un diámetro en la punta de  $\sim 150 \mu\text{m}$ ), alimentada por un sistema de perfusión de seis vías operado por gravedad, ubicada aproximadamente a  $300 \mu\text{m}$  de la célula en estudio. Todas las soluciones de trabajo aplicadas por este sistema de seis vías, excepto aquellas diseñadas para estudiar el efecto del  $Mg^{2+}$  sobre las corrientes producidas por la ACh, fueron preparadas en una solución salina que contenía  $Ca^{2+}$  0.5 mM y sin  $Mg^{2+}$ , con el objetivo de optimizar las condiciones experimentales para medir las corrientes a través del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  (Weisstaub *et al.*, 2002). Las soluciones de trabajo estaban compuestas por (en mM): NaCl 155, KCl 5.8,  $CaCl_2$  0.5,  $NaH_2PO_4$  0.7, D-glucosa 5.6 y HEPES 10, pH 7.4. En los experimentos donde se estudió la permeabilidad al  $Ca^{2+}$  y la modulación de las corrientes sinápticas espontáneas por este catión, la solución de trabajo estaba compuesta por (en mM): NaCl 100, KCl 5.8,  $CaCl_2$  0-10, D-glucosa 5.6 y HEPES 10, pH 7.4; la osmolaridad de la solución se ajustó a 300-320 mosmol  $kg^{-1}$  con sacarosa ( $\sim 26 g l^{-1}$ ).

Se utilizaron las siguientes soluciones intracelulares: (1) KCl-EGTA (para registrar las corrientes combinadas *nAChR*+*SK*): (en mM) KCl 135,  $MgCl_2$  3.5,  $CaCl_2$  0.1, ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetil ester)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 5, HEPES 5 y  $Na_2ATP$  2.5, pH 7.2 y (2) KCl-BAPTA (para registrar las corrientes *nAChR* aisladas): para evitar la activación de los canales SK2 por el  $Ca^{2+}$ , se agregó en la solución intracelular el quelante rápido de calcio, ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), (en mM) KCl 135,  $MgCl_2$  3.5,  $CaCl_2$  0.1, BAPTA 10, HEPES 5 y  $Na_2ATP$  2.5, pH 7.2. Además, a las soluciones de trabajo se les agregó apamina, un bloqueante específico de canales SK2, en una concentración de 1-10 nM (Kohler *et al.*, 1996).

En los experimentos donde se estudió la dependencia del voltaje y/o los cambios en el potencial de reversión de las corrientes colinérgicas, se reemplazó el KCl de la solución de la pipeta por CsCl o por Cs-Gluconato para eliminar las corrientes de  $K^+$  dependientes del voltaje (Kros *et al.*, 1998). La osmolaridad de las soluciones intracelulares varió entre 270 y 290 mosmol  $kg^{-1}$ . Las corrientes sinápticas espontáneas se registraron inmediatamente después de establecerse la configuración de *whole-cell* y en

presencia de una solución extracelular conteniendo  $\text{Ca}^{2+}$  0.5 mM y con una pipeta de registro conteniendo KCl-EGTA (para registrar las corrientes combinadas  $n\text{AChR} + \text{SK}$ ) o KCl-BAPTA (para registrar las corrientes  $n\text{AChR}$  aisladas).



**Figura 8: Preparación de órgano de Corti.** *A* y *B* esquemas de la preparación de explantos agudos del órgano de Corti, con la membrana basilar (MB) apoyada sobre la cámara de registros. *B*, remoción de algunas células de soporte que se encuentran por encima de las CCIs utilizando una pipeta de limpieza para tener un mejor acceso a las células. Los cuerpos celulares de las CCIs están orientados de forma paralela al plano de la imagen, mientras que las CCEs y las células de Deiters (CDs) están situadas paralelas al eje óptico. *C*, los estereocilios en forma de V de las CCEs están en foco y se visualizan los cuerpos celulares de las CCIs a lo largo del eje. *D*, representación esquemática de una pipeta de registro sobre una CCI. Esquema adaptado de Glowatzki *et al.* (1995).

*Evaluación de la permeabilidad al  $Ca^{2+}$ .*

Para evaluar la permeabilidad al  $Ca^{2+}$ , las corrientes iónicas a través del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  fueron producidas por la aplicación exógena de ACh en CCIIs sostenidas a diferentes potenciales de membrana (de  $-40$  a  $+30$  mV, en incrementos de 5 mV). La permeabilidad relativa de iones divalentes a monovalentes ( $P_{Ca}/P_{Na}$ ) se evaluó observando el desplazamiento en el potencial de reversión ( $E_{rev}$ ) de las corrientes, al variar las concentraciones de  $Ca^{2+}$  extracelular de 0.1 a 10 mM y manteniendo la concentración de  $Na^+$  fija en 100 mM. Los datos fueron luego ajustados por la ecuación de voltaje de campo constante de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK), ampliada para incluir cationes divalentes (Jan y Jan, 1976). Se asumió que la permeabilidad de los iones  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Cs^+$  es idéntica y que la permeabilidad al  $Cl^-$  es nula. Se consideró, además, que la contribución de la densidad de carga superficial es despreciable y no se la incluyó en los cálculos de  $P_{Ca}/P_{Na}$  (Mayer y Westbrook, 1987). Entonces, teniendo en cuenta la permeabilidad a los iones  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , el  $E_{rev}$  se evaluó utilizando:

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{-b + (b^2 - 4ac)^{1/2}}{2a}$$

en donde:

$$a = [K^+]_i + 4 \frac{P_{Ca}}{P_K} [Ca^{2+}]_i + \frac{P_{Na}}{P_K} [Na^+]_i,$$

$$b = [K^+]_i - [K^+]_o + \frac{P_{Na}}{P_K} ([Na^+]_i - [Na^+]_o),$$

$$c = [K^+]_o - \frac{P_{Na}}{P_K} [Na^+]_o - 4 \frac{P_{Ca}}{P_K} [Ca^{2+}]_o,$$

$P_K$ ,  $P_{Na}$  y  $P_{Ca}$  son las permeabilidades al  $K^+$ ,  $Na^+$ , y  $Ca^{2+}$ , respectivamente (en nuestras condiciones experimentales  $[K^+]_i$  se reemplazó por  $[Cs^+]_i$ );  $R$  es la constante de los gases,  $F$  es la constante de Faraday,  $T$  es la temperatura absoluta ( $RT/F$  es igual a 25.3 mV a  $20^\circ C$ ).  $[K^+]_o$ ,  $[Ca^{2+}]_o$  y  $[Na^+]_o$ , son las concentraciones extracelulares de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ , respectivamente y  $[K^+]_i$ ,  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[Na^+]_i$ , son las concentraciones internas de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y

Na<sup>+</sup> respectivamente. Para poder comparar estos resultados con aquellos reportados para los receptores recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  (Katz *et al.*, 2000; Weisstaub *et al.*, 2002) y para los ortólogos humanos recombinantes (Sgard *et al.*, 2002), en nuestros cálculos se utilizaron las concentraciones iónicas y no actividades iónicas.

*Evaluación de la modulación por cationes divalentes.*

Los efectos del Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> extracelular sobre las corrientes iónicas a través del nAChR nativo, se estudiaron midiendo la amplitud de las respuestas a ACh 100  $\mu$ M luego de variar la concentración de estos cationes de 0 a 10 mM. En todos los casos, se preincubó la preparación durante 1 minuto con la concentración del catión divalente a ser estudiado. Los valores de amplitudes obtenidos a cada concentración fueron normalizados a aquellos obtenidos en la misma célula a una concentración de 0.5 mM del catión divalente evaluado. Los valores correspondientes a las distintas células se promediaron y se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (S.E.M.).

*Evaluación de la inhibición.*

Para el Mg<sup>2+</sup> y antagonistas (nicotina, estricnina, ICS-205,930, bicuculina, linopiridina y las  $\alpha$ -conotoxinas), el valor de la concentración del antagonista que produce el 50 % de bloqueo de la respuesta a la ACh (CI<sub>50</sub>) se evaluó en presencia de Ca<sup>2+</sup> 0.5 mM y se calculó utilizando:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{I_{\max}}{(1 + 10^{(\log CI_{50} - X)^{n_H}})}$$

en donde  $I$  es la amplitud de la corriente obtenida a las distintas concentraciones del antagonista,  $I_{\max}$  es la corriente obtenida en ausencia del antagonista,  $X$  es el logaritmo de la concentración del antagonista y  $n_H$  es el coeficiente de Hill. Los valores de CI<sub>50</sub> fueron obtenidos para cada célula y luego promediados. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  S.E.M. Para analizar el efecto inhibitorio del Mg<sup>2+</sup> y el de los antagonistas, en todos los



casos, se preincubó durante 1-10 minutos con la misma concentración del compuesto a ser estudiado.

*Evaluación del efecto del  $Ca^{2+}$  sobre la afinidad del receptor por la ACh.*

Para evaluar los cambios en la afinidad aparente y en la respuesta máxima a la ACh, se realizaron curvas de concentración-respuesta para la ACh en la misma célula en  $Ca^{2+}$  0 y 0.5 mM. Los valores se normalizaron a los máximos obtenidos en  $Ca^{2+}$  0.5 mM. El valor de la concentración del agonista que provoca una corriente del 50% de la máxima ( $CE_{50}$ ), se calculó utilizando la ecuación:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{I_{\max}}{(1 + 10^{(\log CE_{50} - X)^{nH}})}$$

Se utilizó esta misma ecuación para evaluar el efecto de la linopiridina sobre la afinidad aparente del nAChR recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  por la ACh.

*Análisis de las curvas I-V y de las corrientes sinápticas .*

Para todas las curvas de corriente en función del potencial (*I-V*) realizadas en las células ciliadas de la preparación del órgano de Corti, los potenciales de sostén fueron corregidos por los potenciales de juntura (de -4 mV y -17 mV para las soluciones intracelulares de KCl (o CsCl) y Cs-gluconato, respectivamente). No se realizaron correcciones en el voltaje debido a caídas de potencial a través de resistencias en serie sin compensar.

Las corrientes sinápticas se analizaron utilizando el programa Minianalysis (Synaptosoft, Jaejin Software, Leonia, NJ, EE.UU.). Los valores del tiempo de decaimiento de la corriente (*t*) fueron ajustados a una exponencial simple.

## Expresión de receptores recombinantes en oocitos de *Xenopus laevis* y registros electrofisiológicos.

### *Producción de ARNc.*

Se utilizaron ADNc de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  insertos en el plásmido modificado pGEMHE, un vector que, para optimizar la expresión en oocitos de *Xenopus laevis*, incluye en los flancos del segmento de múltiples sitios de clonado (*polylinker*), secuencias de regiones no traducidas 5' y 3' de un gen de *Xenopus* que codifica para la  $\beta$ -globina (Liman *et al.*, 1992). El vector se amplificó en la cepa bacteriana DH5 $\alpha$  y el ADN plasmídico se obtuvo mediante una purificación de acuerdo al procedimiento WIZARD plus SV Minipreps (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Los plásmidos fueron linealizados utilizando la endonucleasa de restricción NheI (New England Biolabs Inc., EE.UU.) 0.5 U/ $\mu$ l, la cual corta en un único sitio en el extremo 3' del sitio de clonado múltiple. Posteriormente fueron tratados con proteinasa K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) 100  $\mu$ g/ml por 30 minutos a 50°C, sometidos a extracción con fenol:CHCl<sub>3</sub>, precipitados con etanol y LiCl y resuspendidos en H<sub>2</sub>O libre de ARNasa. Los plásmidos así tratados fueron utilizados para obtener el ARNc por transcripción *in vitro* utilizando el kit de transcripción mMessage mMachinE T7 (Ambion Inc., Austin, TX, EE.UU.). Las reacciones de transcripción se realizaron en presencia de un análogo de la caperuza (*cap*): Me<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G en proporción 4:1 con respecto a GTP. El ARNc fue almacenado en H<sub>2</sub>O libre de ARNasas a -70°C.

### *Obtención y preparación de los oocitos para la inyección.*

Se utilizaron hembras de *Xenopus laevis* obtenidas comercialmente (Nasco, Modesto, CA, EE.UU.). Se mantuvieron en un bioterio adecuado, de ambiente controlado (16-18 °C), con un régimen de 12hs luz /12hs oscuridad, en grupos de dos, en recipientes de 10 litros con agua limpia y sin cloro, y alimentadas semanalmente.

Para la obtención de los oocitos, las ranas fueron anestesiadas con ~1 g/ml del etil ester del ácido 3-aminobenzoico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) disuelto en el agua. Mediante una pequeña incisión en el abdomen, se les extrajeron lóbulos del ovario. Los oocitos maduros (estadios V y VI) fueron parcialmente separados bajo lupa

con ayuda de pinzas y luego tratados con una solución de colagenasa tipo I (Worthington Biochem Corp. Lakewood, NJ, EE.UU.) 2 mg/ml, disuelta en una solución salina sin  $\text{Ca}^{2+}$  de la siguiente composición (en mM): NaCl 96, KCl 2, HEPES 5,  $\text{MgCl}_2$  5, pH 7.6, con agitación lenta para remover la capa folicular durante no más de 60 minutos. Luego, los oocitos fueron lavados varias veces con la misma solución para eliminar los restos de colagenasa. Los oocitos fueron seleccionados bajo lupa de acuerdo a su tamaño y apariencia y el epitelio ovárico fue removido con pinzas de disección. Luego se los mantuvo a 17 °C en una solución salina normal (en mM): NaCl 88,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.33,  $\text{CaCl}_2$  0.41, KCl 1,  $\text{MgSO}_4$  0.82,  $\text{NaHCO}_3$  2.4, HEPES 10 y gentamicina 0,1 mg/ml, pH 7.6, en viales, en grupos de no más de 50 oocitos por vial.

#### *Inyección del ARNc.*

Los oocitos seleccionados fueron inyectados dentro de las 24 hs posteriores a su extracción. La inyección del ARNc se realizó con un microinyector automático (Drummond Scientific Company, Broomall, PA, EE.UU.). El microinyector posee un émbolo en el que se colocan jeringas de vidrio. Estas son preparadas a partir de capilares de vidrio (Drummond Scientific Company, Broomall, PA, EE.UU.), estiradas por calor utilizando un estirador de pipetas modelo PB-7 (Narishige Co. Ltd, Tokio, Japón). Las pipetas fueron llenadas con aceite mineral y cargadas con ~3  $\mu\text{l}$  de solución de ARNc. Una vez preparado el microinyector, los oocitos se colocaron en una caja de Petri de 35 mm de diámetro cuyo fondo posee una membrana de polietileno enrejada que limita su movimiento. Los oocitos fueron inyectados con 0.01-1 ng (50nl) de ARNc, conteniendo cantidades equimolares de las subunidades recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ .

#### *Registros electrofisiológicos en oocitos.*

Dos a seis días luego de la inyección, se evaluaron las propiedades de los receptores recombinantes mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos (TEVC, *two-electrode voltage clamp*). Se utilizaron micropipetas de vidrio estiradas con un estirador de pipetas modelo PB-7 (Narishige Co. Ltd, Tokio, Japón) para lograr una punta fina que no dañara al oocito (resistencia ~1-2 M $\Omega$ ). Las mismas fueron llenadas con una solución de KCl 3M. Los electrodos de registro de

Ag/AgCl insertos en micropipetas, se conectaron a los cabezales de un amplificador Geneclamp 500 (Axon Instruments, Union City, CA, EE.UU.). Cada cabezal estaba montado en un micromanipulador para el posicionamiento de los electrodos. La preparación fue llevada a tierra utilizando dos electrodos de Ag/AgCl sumergidos en la misma solución que baña los oocitos en la cámara de registro conectados a la sonda del baño (VG-2a) del amplificador.

La generación de protocolos de voltaje y la adquisición de datos se realizaron mediante una tarjeta analógico-digital Digidata 1200 (Axon Instruments, Union City, CA, EE.UU.) y el programa pClamp 7.0 (Axon Instruments, Union City, CA, EE.UU.). Todos los registros se realizaron a un potencial de sostén de  $-70\text{mV}$ .

Durante los registros electrofisiológicos, los oocitos fueron sometidos a un flujo continuo ( $\sim 10\text{ ml/min}$ ) con una solución salina normal de la siguiente composición (en mM): NaCl 115, KCl 2.5,  $\text{CaCl}_2$  1.8 y HEPES 10, pH 7.2. En todos los casos la ACh y la linopiridina fueron añadidas al baño, diluidas en la solución del baño a partir de soluciones madre de una concentración de 100 mM. La linopiridina fue agregada al baño, por el tiempo indicado en cada una de las figuras, antes de su coaplicación con el agonista. Se realizaron lavados de 3 minutos luego de cada aplicación del agonista.

El protocolo de estimulación para obtener las curvas de corriente en función del potencial ( $I-V$ ) consistió en una rampa lineal desde  $-120$  a  $+50\text{ mV}$  con una duración de 2 segundos, partiendo de un potencial de sostén de  $-70\text{ mV}$ . Las rampas se efectuaron durante la aplicación de ACh  $10\text{ }\mu\text{M}$ , 10 segundos luego de observado el pico de la respuesta. La corrección de las corrientes de fuga se realizó mediante la sustracción digital de una curva  $I-V$  obtenida mediante la aplicación de una rampa de voltaje realizada previo a la aplicación de la ACh.

Los oocitos poseen canales endógenos de cloruro activables por calcio ( $\text{ICl}_{\text{Ca}}$ ) (Miledi y Parker, 1984; Boton *et al.*, 1989). Para minimizar la activación de estos canales en respuesta a la entrada de calcio a través de los receptores recombinantes  $\alpha 9\alpha 10$ , los oocitos fueron incubados en presencia de un quelante de calcio capaz de atravesar la membrana, BAPTA-AM (acetoximetilester del ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetra acético)  $100\text{ }\mu\text{M}$ , durante las 3 horas previas a los registros electrofisiológicos. Una vez dentro del oocito, este compuesto es escindido por las

esterasas endógenas pasando a su forma ácida, lo cual impide que vuelva a atravesar la membrana plasmática. Estudios previos han demostrado que este tratamiento es capaz de quelar efectivamente los iones  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares y por lo tanto de minimizar la activación de la  $\text{ICl}_{\text{Ca}}$  (Gerzanich *et al.*, 1994).

### **Análisis estadístico.**

La evaluación estadística de los datos se realizó mediante el test *t* de Student (cuando se compararon sólo dos poblaciones de datos). Las comparaciones múltiples se realizaron con ANOVA seguida del test de Tukey. En ambos casos los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos. Los ajustes de las curvas y los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Graph Pad Prism 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

### **Drogas utilizadas.**

Las siguientes drogas fueron adquiridas de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EE.UU.): Cloruro de acetilcolina (ACh), BAPTA ácido, BAPTA-AM,  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , metil bromuro de (-)-bicuculina, clorhidrato de estricnina, clorhidrato de ICS-205,930, di-*d*-tartrato de (-)-nicotina, apamina y linopiridina. Las soluciones de trabajo de todas las drogas fueron preparadas mediante dilución en solución salina, a partir de alícuotas de soluciones madre de concentración  $\geq 1$  mM conservadas a  $-20$  °C. La linopiridina se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) en una concentración de 100 mM. La concentración de DMSO en la solución de registro fue siempre  $\leq$  a 0.1%. Esta concentración de DMSO no tuvo ningún efecto sobre la corriente de sostén ni sobre las corrientes producidas por la ACh, tanto en las CCI's como en los oocitos que expresaban los receptores  $\alpha 9\alpha 10$ . El BAPTA-AM se disolvió en DMSO en una concentración 100 mM y se almacenó en alícuotas a  $-20$ °C. Las alícuotas se descongelaron y se diluyeron 1000 veces en solución salina normal en el momento de ser utilizadas.

## *Parte I*

*Caracterización biofísica y farmacológica del receptor  
colinérgico nicotínico presente en las células ciliadas  
internas de la cóclea de ratas*

## Introducción

En la cóclea madura de mamíferos, las CCIs transducen los estímulos auditivos y se comunican con el sistema nervioso central mediante las dendritas de las neuronas aferentes. Se considera que la inervación eferente directa a estas células adultas es mínima o nula. En contraste, las CCEs maduras reciben principalmente una inervación eferente desde la oliva superior (Guinan, 1996). Durante el desarrollo postnatal, previo al comienzo de la audición (P12-P13 en ratas), las fibras eferentes olivococleares inervan transitoriamente a las CCIs inmaduras (Simmons *et al.*, 1996b; Pujol *et al.*, 1998). La sinapsis entre las fibras eferentes olivococleares y las CCIs es inhibitoria y está mediada por un receptor colinérgico nicotínico (Glowatzki y Fuchs, 2000). Se propone que el influjo de calcio a través de este receptor activaría canales de potasio dependientes de calcio del tipo SK2 que llevan a la hiperpolarización de la célula (Glowatzki y Fuchs, 2000).

Los estudios sobre las propiedades farmacológicas y biofísicas del receptor colinérgico nativo de las células ciliadas han sido realizados en su totalidad en las CCEs de mamíferos (Doi y Ohmori, 1993; Erostequi *et al.*, 1994a; Blanchet *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1996; Dulon y Lenoir, 1996; Evans, 1996; Nenov *et al.*, 1996b; Oliver *et al.*, 2000) y en las células ciliadas cortas del pollo, equivalentes a las CCEs de mamíferos (Fuchs y Murrow, 1992a, b; McNiven *et al.*, 1996). Estos estudios, conjuntamente con experimentos de localización celular (Elgoyhen *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1998a; Morley *et al.*, 1998; Elgoyhen *et al.*, 2001; Morley y Simmons, 2002), sugieren que el receptor nativo de las CCEs está compuesto por las subunidades nicotínicas  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  (Elgoyhen *et al.*, 1994; Elgoyhen *et al.*, 2001; Weisstaub *et al.*, 2002). El receptor nativo de las CCEs presenta un perfil farmacológico peculiar e indistinguible del que presentan los receptores recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$ . Una característica de estos receptores es que no son activados por la nicotina, el agonista colinérgico típico de la familia de los nAChRs (Elgoyhen *et al.*, 1994; Elgoyhen *et al.*, 2001; Sgard *et al.*, 2002). Estudios previos realizados en el laboratorio de la Dra. Elgoyhen con los receptores recombinantes homoméricos  $\alpha 9$  y heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$  expresados en oocitos de *Xenopus laevis*, mostraron que ambos receptores son muy permeables al ión calcio. Sin

embargo, ambos receptores difieren en otras características biofísicas como la sensibilidad al voltaje, la modulación por el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y el patrón de desensibilización (Katz *et al.*, 2000; Elgoyhen *et al.*, 2001; Weisstaub *et al.*, 2002). Además del hecho de que las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  son las únicas subunidades nicotínicas que se expresan en las CCEs y CCIs de la cóclea (Elgoyhen *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1998a; Morley *et al.*, 1998; Elgoyhen *et al.*, 2001; Morley y Simmons, 2002), la generación de un ratón que posee una mutación nula en el gen *Acra 9* demostró que la subunidad  $\alpha 9$  es un componente fundamental del receptor colinérgico de las células ciliadas (Vetter *et al.*, 1999). Por otro lado, la pérdida de receptores colinérgicos funcionales en las CCIs luego del comienzo de la audición se correlaciona con el cese de la expresión de la subunidad  $\alpha 10$ , lo que sugiere que esta subunidad es también un componente fundamental del receptor nativo de las CCIs (Katz *et al.*, 2004 y ver Parte II de esta tesis).

El objetivo de esta parte del trabajo fue realizar una caracterización biofísica y farmacológica del receptor colinérgico nativo presente en las CCIs en aislamiento del canal SK2, para comparar estos resultados con los obtenidos para los receptores recombinantes homoméricos  $\alpha 9$  y heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$  expresados en oocitos de *Xenopus laevis*. De los resultados obtenidos, se puede inferir que el receptor nativo de las CCIs es un heterómero  $\alpha 9\alpha 10$  y no un homómero  $\alpha 9$ .

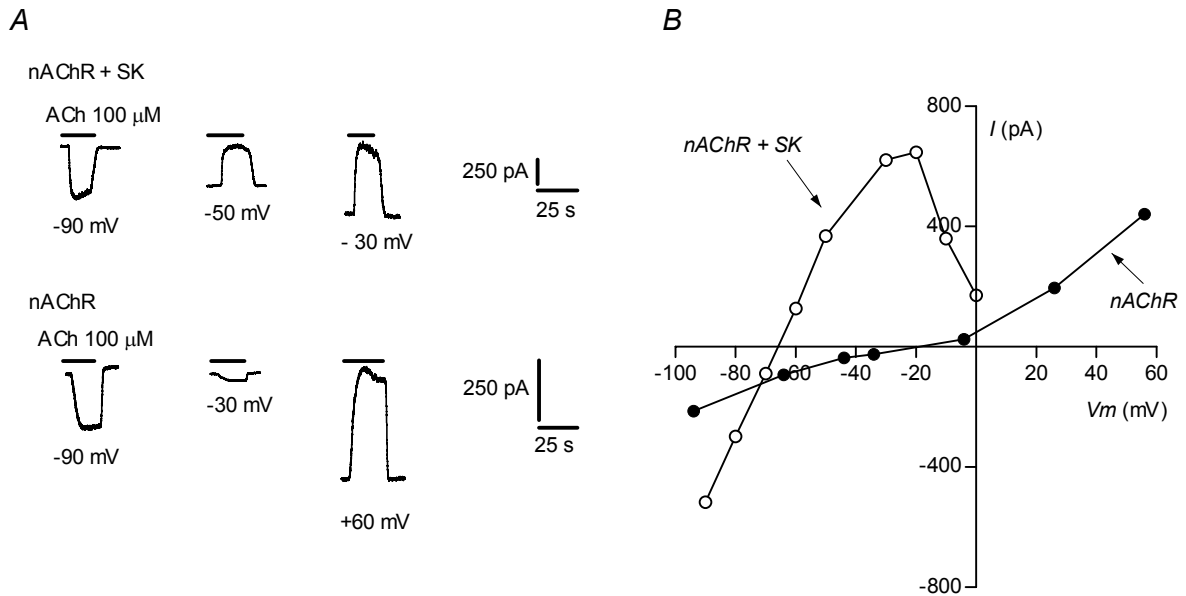


## Resultados

*Aislamiento de las corrientes a través del nAChR de las corrientes a través del canal SK2.*

A partir de registros electrofisiológicos en las CCI de rata previo al comienzo de la audición, Glowatzki y Fuchs (2000) demostraron la presencia de corrientes sinápticas y de corrientes activadas por la aplicación de ACh. Estos autores observaron que estas respuestas son inhibitorias y sugieren que estarían mediadas por un receptor nicotínico acoplado a la activación de un canal de  $K^+$  sensible al  $Ca^{2+}$ .

Como se muestra en la *Figura 9A* (*nAChR + SK*), la aplicación de ACh 100  $\mu M$  en el medio extracelular provocó corrientes entrantes en las CCI de ratas en P9-11 sostenidas a un potencial de membrana de  $-90$  mV y corrientes salientes a potenciales de  $-50$  y  $-30$  mV. La curva de corriente en función del voltaje (*I-V*) (*Figura 9B*, *nAChR + SK*) presentó forma de campana y el potencial de reversión de las corrientes fue de  $-67.6 \pm 4.2$  mV ( $n=5$ ). Este potencial de reversión es cercano al valor del potencial de equilibrio del potasio ( $E_K$ ) que es de  $-82$  mV. En estas condiciones experimentales, en las cuales se utilizó una solución intracelular que contenía KCl-EGTA, las corrientes activadas por la ACh están mediadas por un flujo combinado de cationes a través del nAChR y de  $K^+$  a través de los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  del tipo SK2. A potenciales de membrana negativos al  $E_K$ , como por ejemplo a  $-90$  mV, la corriente resultante activada por la aplicación de ACh está mediada por un flujo de corriente entrante tanto por el nAChR como por el canal SK2, mientras que a voltajes entre  $E_K$  y 0 mV la corriente resultante es saliente debido a que el flujo saliente de iones a través del canal SK2 es mayor que la corriente entrante a través del nAChR (*Figura 9A y B*). Con el objetivo de aislar la corriente colinérgica, bloqueamos la corriente de  $K^+$  activada por  $Ca^{2+}$  utilizando BAPTA, un quelante rápido de  $Ca^{2+}$ , en la solución intracelular y apamina, un bloqueante específico del canal SK2, en la solución extracelular. En estas condiciones experimentales, las corrientes revirtieron cerca de 0 mV ( $E_{rev} = -10.7 \pm 1.6$  mV;  $n=3$ ), potencial de reversión característico de los canales catiónicos no selectivos. El valor de  $E_{rev}$  de las corrientes resultó similar al observado para los receptores recombinantes



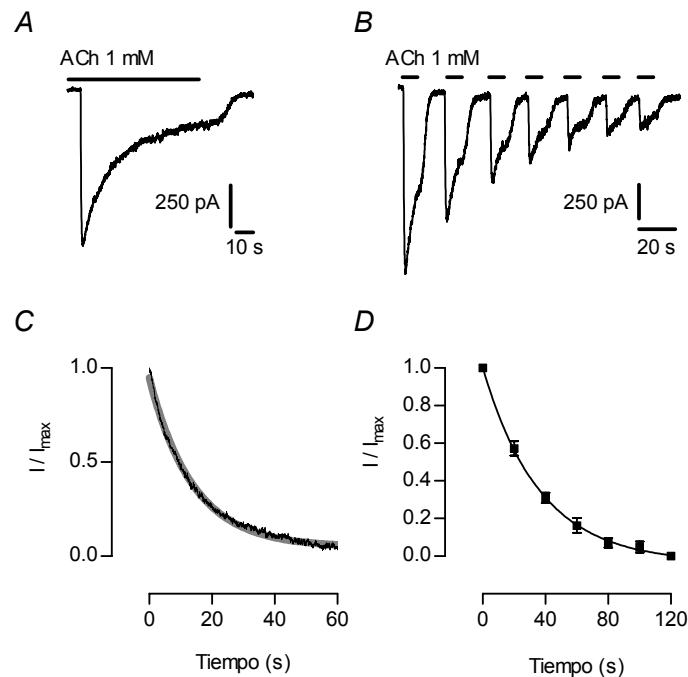
**Figura 9: Sensibilidad al voltaje de las corrientes colinérgicas aisladas y de las acopladas al canal SK2.** A, registros representativos a distintos potenciales de membrana de las corrientes activadas por ACh 100  $\mu$ M, combinadas (*nAChR* + *SK*; solución intracelular: KCl-EGTA) y aisladas (*nAChR*; solución intracelular: CsCl-BAPTA + apamina 1nM en la solución extracelular). B, curvas *I-V* representativas de las corrientes evocadas por la aplicación de ACh 100  $\mu$ M, combinadas (*nAChR* + *SK*) y aisladas (*nAChR*).

homoméricos  $\alpha 9$  y heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$  (Katz *et al.*, 2000; Elgoyhen *et al.*, 2001). La curva *I-V* para el nAChR nativo aislado del canal SK2 fue más lineal, como se puede observar en la *Figura 9B* (*nAChR*). Estos resultados muestran que utilizando BAPTA en una concentración de 10 mM en la solución intracelular de la pipeta y apamina 1nM en la solución extracelular aislamos la corriente colinérgica de la corriente de  $K^+$  acoplada. Los experimentos que se muestran a continuación fueron realizados en condiciones en las cuales el receptor colinérgico está aislado del canal SK2, a menos que se indique lo contrario.

#### *Patrón de desensibilización del receptor nativo de las CCI.*

Ha sido demostrado que el receptor recombinante homomérico  $\alpha 9$  y el heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  difieren en su patrón de desensibilización en presencia de

concentraciones saturantes del agonista (Elgoyhen *et al.*, 2001). Las respuestas producidas por la ACh en oocitos que expresan el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  se reducen luego de la aplicación continua (1 minuto) o intermitente (durante 10 s cada 40 s) del agonista. Sin embargo, las respuestas en oocitos que expresan el receptor  $\alpha 9$  no se desensibilizan significativamente con ninguno de los dos protocolos (Elgoyhen *et al.*, 2001). La *Figura 10* muestra que el receptor nativo de las CCIIs también se desensibiliza luego de la aplicación continua (1 minuto) o intermitente (durante 10 s cada 20 s) del agonista. En presencia de ACh 1mM, aplicada de manera continua, las corrientes a través del nAChR decayeron con una constante de tiempo de  $13.8 \pm 0.5$  s ( $n=4$ , *Figura 10A y C*). En el caso de la aplicación intermitente del agonista, las amplitudes al pico de las corrientes producidas por la ACh decayeron con una constante de tiempo de  $37.9 \pm 4.2$  s ( $n=3$ , *Figura 10B y D*).



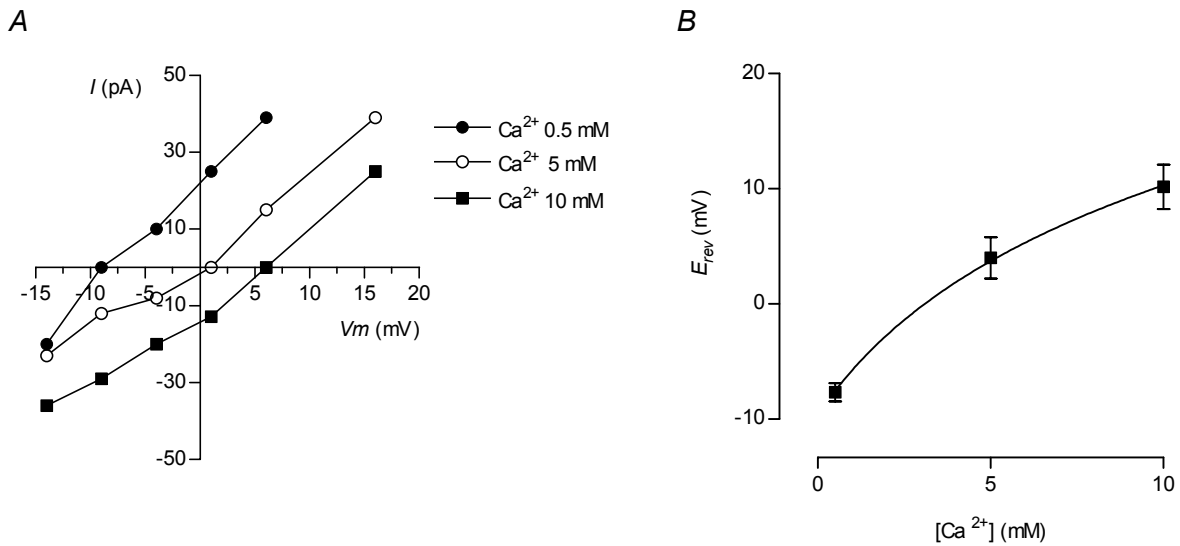
**Figura 10: Patrón de desensibilización del nAChR de las CCIIs.** Registros representativos de las corrientes colinérgicas aisladas activadas por ACh 1 mM de manera continua durante 1 minuto (A) e intermitente (B), en 3-6 CCIIs sostenidas a un voltaje de  $-90$  mV. C, gráfico que representa la relación entre la amplitud de la corriente ( $I$ ) y la corriente máxima ( $I_{max}$ ) en función del tiempo durante la aplicación continua de ACh 1mM. Se muestra el trazo promedio de 4 CCIIs. La línea gris representa el ajuste de los datos a una exponencial simple ( $\tau_{decaimiento} = 13.8 \pm 0.5$  s). D, gráfico de  $I/I_{max}$  en función del tiempo, durante la aplicación intermitente de ACh. Los datos corresponden a las amplitudes de las corrientes promediadas de 3 CCIIs en cada pulso de ACh. Los datos se ajustaron a una exponencial simple ( $\tau_{decaimiento} = 37.9 \pm 4.2$  s).

*Evaluación de la permeabilidad al calcio del receptor nativo de las CCIIs.*

Los nAChRs son permeables a cationes monovalentes como el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$  y a divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$  (Decker y Dani, 1990; Mulle *et al.*, 1992a, b; Vernino *et al.*, 1992; Bertrand *et al.*, 1993a; Séguéla *et al.*, 1993; Vernino *et al.*, 1994). Se los puede dividir en tres categorías teniendo en cuenta la permeabilidad del  $\text{Ca}^{2+}$  relativa a la del  $\text{Na}^+$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ ). El nAChR muscular es el menos permeable (Decker y Dani, 1990; Vernino *et al.*, 1994), los receptores neuronales heteroméricos presentan una permeabilidad mayor (Fieber y Adams, 1991; Sands y Barish, 1991; Vernino *et al.*, 1992; Vernino *et al.*, 1994) y los homoméricos  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  y  $\alpha 9$  junto con el heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  tienen la mayor permeabilidad relativa al  $\text{Ca}^{2+}$  (Sands y Barish, 1991; Eisele *et al.*, 1993; Katz *et al.*, 2000; Weisstaub *et al.*, 2002).

La naturaleza inhibitoria de la sinapsis colinérgica olivococlear a las CCEs (Fuchs y Murrow, 1992b; Blanchet *et al.*, 1996; Evans, 1996; Dulon *et al.*, 1998; Oliver *et al.*, 2000) e internas (Glowatzki y Fuchs, 2000 y *Figura 9* de esta tesis). depende de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los nAChRs y la subsiguiente activación de canales SK2. Para evaluar la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor nativo de las CCIIs, cuantificamos la magnitud de las variaciones en el potencial de reversión de las corrientes activadas por la ACh al modificar la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. En la *Figura 11A* se muestran las curvas *I-V* representativas obtenidas en las distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Al incrementar la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  se produjo un corrimiento positivo en el  $E_{rev}$  de las corrientes, lo que sugiere que el receptor nativo es permeable a este catión. En la *Figura 11B* se graficaron los valores promedio de los  $E_{rev}$  obtenidos en distintas CCIIs en función de la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos datos fueron ajustados mediante la ecuación de GHK ampliada para incluir cationes divalentes (ver Materiales y Métodos). La  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  fue de  $8 \pm 0.9$  ( $n=6$  células), valor similar al reportado para el receptor recombinante homomérico  $\alpha 9$  y al heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  (Katz *et al.*, 2000; Weisstaub *et al.*, 2002). Cuando utilizamos una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de 10 mM, observamos una activación residual de canales SK2, aún en presencia de BAPTA 10 mM en la solución intracelular y apamina 1 nM en la solución del baño. Por lo tanto, para estos experimentos de permeabilidad, se utilizó apamina en una concentración de 10 nM a todas las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  examinadas para

minimizar la probabilidad de que a una concentración 10 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  se activaran los canales SK2. Aún así, no se puede descartar una pequeña contribución residual de los canales SK2 a la corriente total producida por la ACh en  $\text{Ca}^{2+}$  10 mM. Si este fuese el caso, estaríamos subestimando el corrimiento en el  $E_{rev}$  de las corrientes al cambiar a esta alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y por lo tanto estaríamos subestimando el valor de  $P_{Ca}/P_{Na}$ .



**Figura 11: Permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  del nAChR nativo de las CClIs.** *A*, curvas  $I$ - $V$  obtenidas en distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (0.5, 5 y 10 mM) y a una concentración de  $\text{Na}^+$  constante de 100 mM. Puede observarse que el  $E_{rev}$  se corrió hacia potenciales más positivos a medida que se incrementó la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. *B*, gráfico de los  $E_{rev}$  en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $n=3-6$  células). Los datos se ajustaron a la ecuación de GHK extendida para incluir cationes divalentes (ver Materiales y Métodos). La  $P_{Ca}/P_{Na}$  fue de  $8 \pm 0.9$ .

#### *Modulación del receptor nativo de las CClIs por $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Ba}^{2+}$ y $\text{Mg}^{2+}$ .*

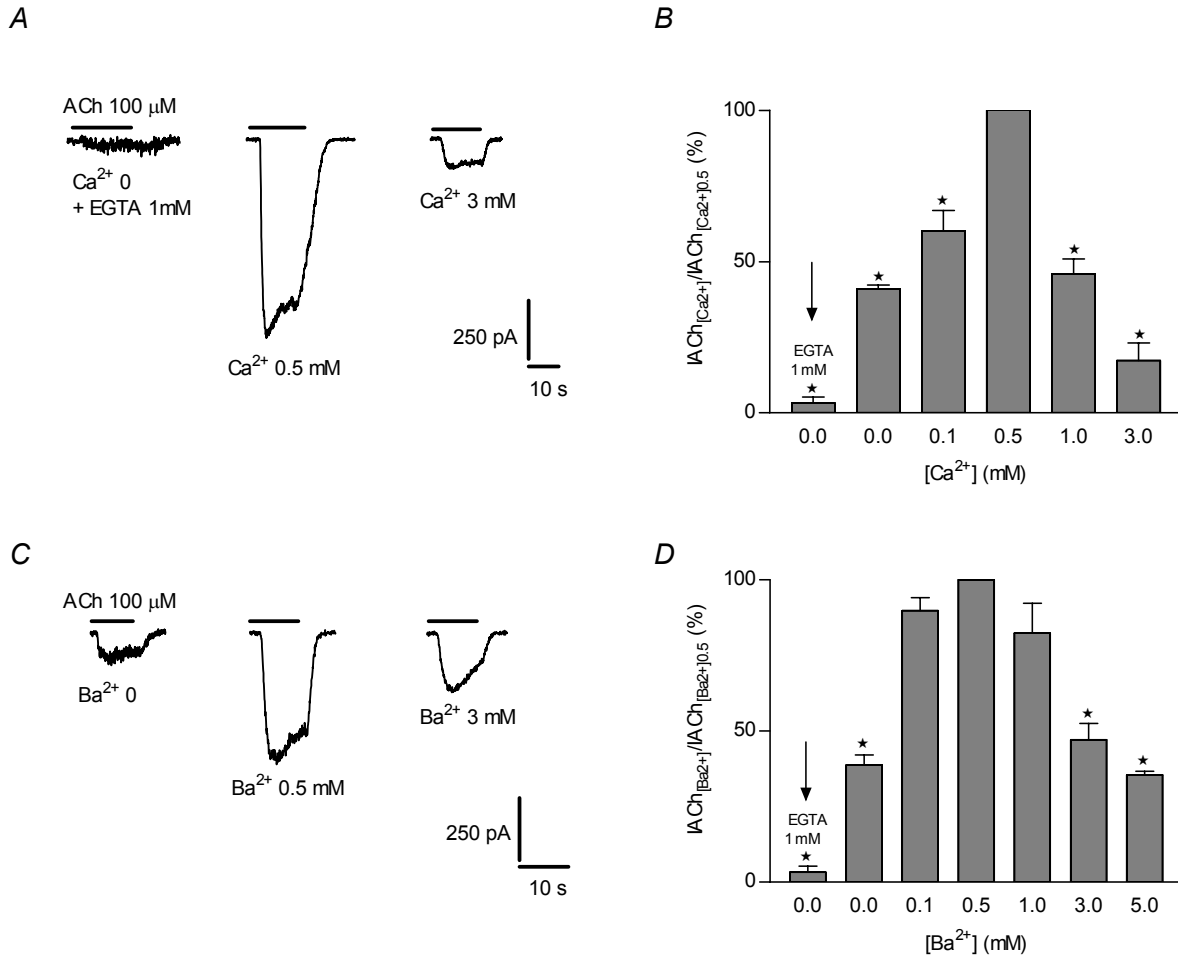
Los iones divalentes modulan la actividad de varios nAChRs. El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es capaz de potenciar las corrientes macroscópicas a través de distintos receptores neuronales (Decker y Dani, 1990; Mulle *et al.*, 1992a; Vernino *et al.*, 1992; Galzi *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha demostrado que el  $\text{Ca}^{2+}$ , así como otros iones divalentes, producen una disminución de la respuesta unitaria (Mulle *et al.*, 1992a; Vernino *et al.*, 1992). Se postula entonces que la potenciación es independiente del voltaje y que la

misma se evidencia por un incremento en la afinidad aparente del receptor por la ACh, sugiriendo que el  $\text{Ca}^{2+}$  interacciona con sitios alostéricos extracelulares para modular el acople entre la unión del agonista y la apertura del canal (*gating*) (Villaroel *et al.*, 1991; Mulle *et al.*, 1992a; Vernino *et al.*, 1992; Galzi *et al.*, 1996). El bloqueo, en cambio, es dependiente del voltaje, lo que sugiere que el o los sitios de acción del  $\text{Ca}^{2+}$  se encontrarían en el poro del canal (Mulle *et al.*, 1992a; Vernino *et al.*, 1992).

En estudios realizados previamente en el laboratorio de la Dra. Elgoyhen, se mostró que en oocitos que expresan el receptor homomérico  $\alpha 9$ , el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y también el  $\text{Ba}^{2+}$ , bloquean las corrientes activadas por la ACh en forma muy potente ( $\text{CI}_{50}$  100  $\mu\text{M}$ ) y dependiente del voltaje de la membrana (Katz *et al.*, 2000). Se demostró además, que en oocitos que expresan el receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ , el  $\text{Ca}^{2+}$  y también el  $\text{Ba}^{2+}$  producen un efecto dual: a concentraciones micromolares potencian las respuestas activadas por la ACh, mientras que a concentraciones milimolares ( $> 0.5 \text{ mM}$ ) las bloquean (Elgoyhen *et al.*, 2001; Weisstaub *et al.*, 2002).

Con el fin de analizar el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el nAChR nativo de las CCI, se estudiaron las corrientes activadas por la aplicación de ACh 100  $\mu\text{M}$  en presencia de distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Como los nAChR recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  son bloqueados por el  $\text{Mg}^{2+}$  (Katz *et al.*, 2000; Weisstaub *et al.*, 2002), para estudiar la modulación del receptor nativo por el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Ba}^{2+}$ , variamos la concentración de estos cationes en la solución del baño sin compensar por otros iones divalentes. El aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  produjo un efecto bifásico: las respuestas fueron despreciables en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , resultaron potenciadas en presencia de concentraciones micromolares de este ión y se redujeron significativamente en presencia de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  mayores a 0.5 mM (*Figura 12A y B*). La *Figura 12A* muestra registros representativos de las respuestas activadas por la aplicación de ACh 100  $\mu\text{M}$  en concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución extracelular y la *Figura 12B* muestra un diagrama de barras que ilustra el efecto bifásico del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular promediado para las diferentes CCI. Las amplitudes de las respuestas obtenidas en las distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron normalizadas con respecto a la respuesta obtenida en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  0.5 mM en la misma célula. Utilizando un análisis de ANOVA para 1 factor se obtuvieron diferencias significativas entre las

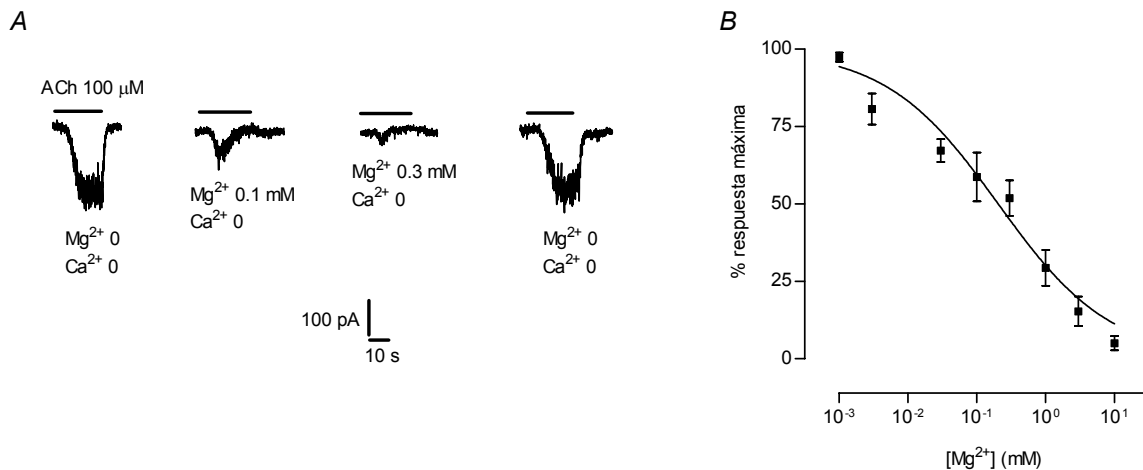
amplitudes de las corrientes obtenidas en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  0, 0.1, 1 y 3 mM con respecto a las obtenidas en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  0.5 mM ( $p < 0.001$ ) (Figura 12B).



**Figura 12: Modulación del nAChR nativo de las CCI por el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Ba}^{2+}$ .** *A*, registros representativos de las corrientes activadas por ACh 100  $\mu\text{M}$  en presencia de distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. *B*, gráfico de barras que ilustra los datos promediados de varias CCI en función de las distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  potenció y bloqueó las corrientes a través del nAChR aislado del canal SK2. En *C* y *D* se muestra lo mismo que en *A* y *B* pero en presencia de  $\text{Ba}^{2+}$  en vez de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los asteriscos indican que las amplitudes de las respuestas obtenidas en una dada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  o de  $\text{Ba}^{2+}$  fueron significativamente diferentes de las obtenidos en 0.5 mM de cada catión. Todos los experimentos se llevaron a cabo en CCI sostenidas a un potencial de membrana de  $-90$  mV ( $n=3-7$  células). Los promedios de las amplitudes de corrientes que se usaron para normalizar los datos fueron de  $-752.4 \pm 49.6$  pA ( $n=7$  células) y  $-480 \pm 99$  pA ( $n=7$  células) en  $\text{Ca}^{2+}$  0.5 y  $\text{Ba}^{2+}$  0.5 mM, respectivamente. Los valores de conductancia ( $G=I/Vm$ ) a  $-90$  mV fueron de  $8.4 \pm 0.5$  nS y  $5.3 \pm 1.1$  nS en  $\text{Ca}^{2+}$  0.5 y  $\text{Ba}^{2+}$  0.5 mM, respectivamente.

Cuando se sustituyó el  $\text{Ca}^{2+}$  por el  $\text{Ba}^{2+}$  en la solución externa, se observó el mismo efecto bifásico: las corrientes activadas por la ACh fueron despreciables en ausencia de  $\text{Ba}^{2+}$ , resultaron potenciadas en presencia de concentraciones micromolares de este ión, y se redujeron significativamente en presencia de concentraciones mayores a 0.5 mM (Figura 12C y D). Utilizando un análisis de ANOVA para 1 factor se obtuvieron diferencias significativas entre las amplitudes de las corrientes obtenidas en presencia de  $\text{Ba}^{2+}$  0, 3 y 5 mM con respecto a  $\text{Ba}^{2+}$  0.5 mM ( $p < 0.001$ ) (Figura 12D).

Para evaluar los efectos del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre el receptor nativo, bañamos a las CCI con una solución externa en la cual el  $\text{Ca}^{2+}$  se reemplazó por el  $\text{Mg}^{2+}$ . En la Figura 13A se muestran registros representativos de las respuestas obtenidas en una solución libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y conteniendo concentraciones crecientes de  $\text{Mg}^{2+}$ , desde 0.1 a 0.3 mM. Las respuestas a la aplicación de ACh 100  $\mu\text{M}$  no fueron potenciadas, sino bloqueadas por el  $\text{Mg}^{2+}$ . Esta reducción en la amplitud de las respuestas fue completamente revertida luego de lavar las células con una solución salina sin  $\text{Mg}^{2+}$  durante 1 minuto. Posteriormente, realizamos una curva de inhibición a concentraciones crecientes de  $\text{Mg}^{2+}$  y en presencia de una concentración fija de  $\text{Ca}^{2+}$  de 0.5 mM (Figura 13B). El  $\text{Mg}^{2+}$  bloqueó al nAChR de las CCI con una  $\text{CI}_{50}$  de  $0.2 \pm 0.01$  mM ( $n=3-11$  células).

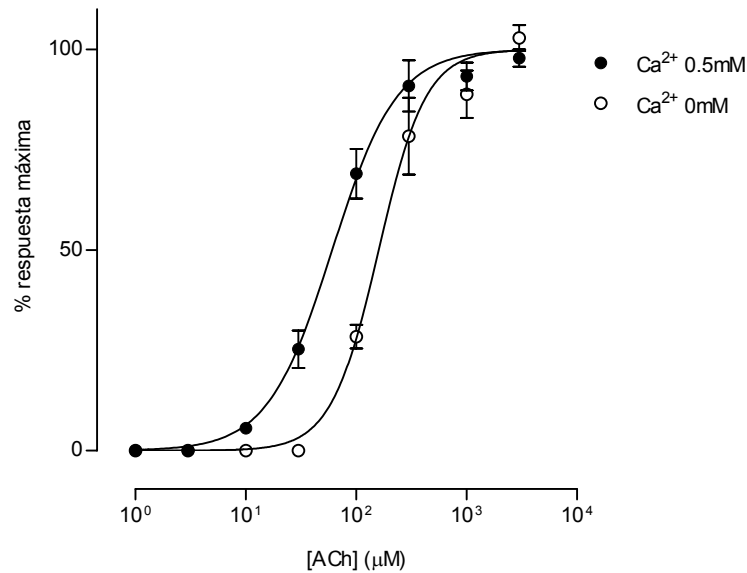


**Figura 13: Efecto del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre las corrientes colinérgicas de las CCI.** A, registros representativos de las corrientes activadas por la aplicación de ACh 100  $\mu\text{M}$  en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y en distintas concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  (0, 0.1 y 0.3 mM). A diferencia de lo observado con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ , el  $\text{Mg}^{2+}$  sólo bloqueó las respuestas a la ACh. B, curva de inhibición obtenida en presencia de ACh 100  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  0.5 mM y concentraciones crecientes de  $\text{Mg}^{2+}$ . Las amplitudes de las corrientes activadas por la ACh en presencia de las distintas concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  fueron normalizadas a los valores obtenidos en ausencia de este catión. El  $\text{Mg}^{2+}$  bloqueó al nAChR nativo de las CCI con una  $\text{CI}_{50}$  de  $0.21 \pm 0.01$  mM,  $n_H = 0.53 \pm 0.06$ . Los datos fueron promediados de 3 a 11 CCI. Todos los experimentos se llevaron a cabo en CCI sostenidas a un potencial de membrana de  $-90$  mV.



*Mecanismo de potenciación por el Ca<sup>2+</sup>.*

La potenciación ejercida por el Ca<sup>2+</sup> extracelular sobre los nAChRs, produce variaciones en distintos parámetros; uno de ellos es la afinidad aparente del receptor por el agonista. Al aumentar la concentración del Ca<sup>2+</sup> extracelular se observa un aumento en la afinidad aparente del receptor por la ACh (Mulle *et al.*, 1992a; Vernino *et al.*, 1992; Galzi *et al.*, 1996; Weisstaub *et al.*, 2002). Con el fin de evaluar si el efecto potenciador del Ca<sup>2+</sup> sobre el receptor nativo de las CCI's podría atribuirse a un mecanismo similar al descrito para otros nAChRs (Mulle *et al.*, 1992a; Vernino *et al.*, 1992; Galzi *et al.*, 1996) y para el receptor recombinante heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  (Weisstaub *et al.*, 2002), se realizaron curvas de concentración-respuesta para la ACh en presencia de distintas concentraciones extracelulares de Ca<sup>2+</sup>. En una solución conteniendo Ca<sup>2+</sup> 0.5 mM, el valor de la CE<sub>50</sub> del receptor nativo por la ACh fue de  $60.7 \pm 2.8 \mu\text{M}$  (n=3-7 células), mientras que, el valor de CE<sub>50</sub> en presencia de Ca<sup>2+</sup> 0 fue de  $160 \pm 6 \mu\text{M}$  (n=4 células) (*Figura 14*). Ambas curvas fueron normalizadas con respecto a la respuesta máxima obtenida en presencia de Ca<sup>2+</sup> 0.5 mM para cada célula. Las diferencias en el valor de la CE<sub>50</sub> obtenidos muestran que: en una solución libre de Ca<sup>2+</sup>, la afinidad aparente del receptor por la ACh es menor que en presencia de Ca<sup>2+</sup> 0.5 mM. Los valores de la respuesta máxima alcanzada en las dos concentraciones de Ca<sup>2+</sup> estudiadas no resultaron estadísticamente significativas (por ejemplo, en una misma CCI, la amplitud de la corriente producida por ACh 1 mM fue de  $-746 \text{ pA}$  en Ca<sup>2+</sup> 0 y de  $-772 \text{ pA}$  en Ca<sup>2+</sup> 0.5 mM), indicando que a altas concentraciones de ACh, la respuesta del receptor nativo se independiza de la presencia de Ca<sup>2+</sup> en el medio extracelular.



**Figura 14: Mecanismo de potenciación por el Ca<sup>2+</sup>.** Curvas de concentración-respuesta en presencia (0.5 mM) y en ausencia de Ca<sup>2+</sup> en la solución extracelular. Se observó un corrimiento hacia la izquierda en la curva luego de aumentar la concentración de Ca<sup>2+</sup> a 0.5 mM. Los valores de CE<sub>50</sub> fueron de  $160 \pm 6 \mu\text{M}$  y  $60.7 \pm 2.8 \mu\text{M}$  para Ca<sup>2+</sup> 0 y 0.5 mM, respectivamente. Las respuestas fueron normalizadas a los valores máximos obtenidos en Ca<sup>2+</sup> 0.5 mM. Los datos fueron promediados de 3 a 7 CCI. Todos los experimentos se llevaron a cabo en CCI sostenidas a un potencial de membrana de  $-90 \text{ mV}$ .

#### *Mecanismo de bloqueo por cationes divalentes.*

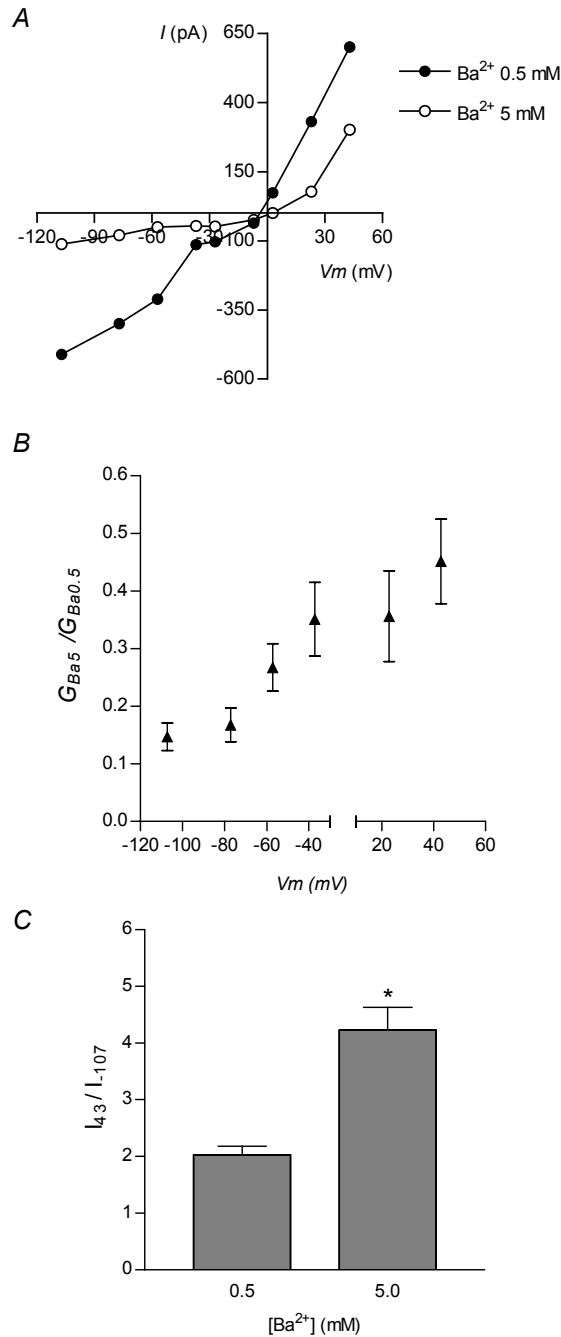
Estudiamos el mecanismo de bloqueo por cationes divalentes utilizando Ba<sup>2+</sup> en lugar de Ca<sup>2+</sup>. El Ba<sup>2+</sup> no activa significativamente a los canales SK2 y de esta manera la contribución de estos canales a la corriente total resulta despreciable (Soh y Park, 2001). Esto es necesario ya que en altas concentraciones de Ca<sup>2+</sup> y a potenciales de membrana hiperpolarizados, situación donde se favorece la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través del nAChR debido a un aumento en la fuerza impulsora para este catión, podrían activarse los canales SK2 y por lo tanto, se estaría subestimando el bloqueo por el Ca<sup>2+</sup>. Las curvas *I-V* en presencia de Ba<sup>2+</sup> 0.5 y 5 mM (Figura 15A), muestran que el bloqueo por el Ba<sup>2+</sup> fue sensible al potencial de membrana, siendo más pronunciado a potenciales hiperpolarizados que a potenciales despolarizados. Este efecto puede apreciarse mejor mediante un gráfico de conductancia en función del potencial de membrana (relación

entre la conductancia en  $Ba^{2+}$  5 mM con respecto a la conductancia en  $Ba^{2+}$  0.5 mM), en donde se observa que la conductancia en  $Ba^{2+}$  5 mM es significativamente menor que en  $Ba^{2+}$  0.5 mM a potenciales hiperpolarizados (*Figura 15B*). En la *Figura 15C* se muestra un gráfico de barras que ilustra la relación entre las amplitudes de las respuestas a la ACh a potenciales despolarizados versus hiperpolarizados a las dos concentraciones de  $Ba^{2+}$  estudiadas. Se puede observar en este gráfico que la rectificación de la curva  $I-V$  fue mayor a concentraciones altas de  $Ba^{2+}$ . La relación entre las amplitudes de las corrientes a +60 y a -90 mV (+43 y -107 mV, valores corregidos por el potencial de juntura) fue de  $2.3 \pm 0.1$  (n=14 CCI) y  $4.2 \pm 0.4$  (n=12 CCI) en presencia de  $Ba^{2+}$  0.5 y 5 mM, respectivamente.

#### *Modulación de las corrientes sinápticas por el $Ca^{2+}$ extracelular.*

En un trabajo previo realizado en neuronas del ganglio simpático, se mostró que al aumentar la concentración del  $Ca^{2+}$  extracelular, se produce un aumento en las amplitudes de las corrientes sinápticas colinérgicas espontáneas (Amador y Dani, 1995). Estos autores sugirieron que la actividad sináptica puede verse afectada por el  $Ca^{2+}$  extracelular actuando sobre la post-sinapsis, modulando la actividad de los nAChRs.

En la preparación de cóclea que utilizamos, observamos corrientes post-sinápticas debido a la liberación espontánea de ACh desde las fibras eferentes olivococleares (Glowatzki y Fuchs, 2000). En una solución salina conteniendo  $Ca^{2+}$  0.5 mM y usando una solución intracelular con KCl-EGTA (ver Materiales y Métodos), las corrientes sinápticas están compuestas por iones que fluyen a través del nAChR y del canal SK2. Como se describió anteriormente por Glowatzki y Fuchs (2000), a voltajes entre -70 y -50 mV estas corrientes sinápticas tienen dos componentes (*Figura 16A, registro superior*), un componente rápido y entrante debido al flujo de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  a través del nAChR y un componente más lento y saliente debido a la apertura de los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$ . El potencial de reposo de las CCI es positivo con respecto al potencial de  $E_K$ , por lo tanto, la actividad eferente hiperpolariza a las CCI. Estas corrientes sinápticas espontáneas fueron entrantes a -90 mV, con una amplitud media de  $-28.4 \pm 1.0$  pA. El tiempo que transcurrió hasta alcanzar la amplitud máxima fue de  $9.6 \pm 0.7$  ms, mientras que el tiempo de decaimiento de las corrientes fue más lento ( $\tau_{decaimiento} =$



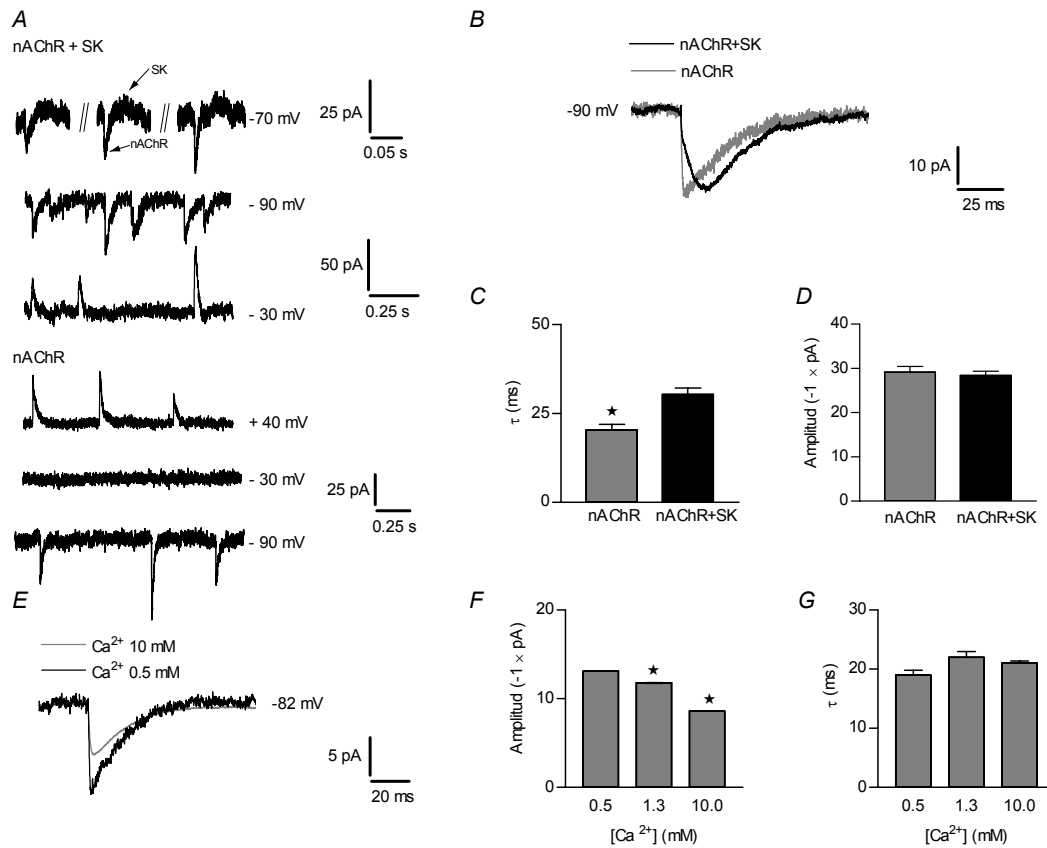
**Figura 15: Dependencia del voltaje del bloqueo por cationes divalentes.** *A*, curvas  $I$ - $V$  representativas obtenidas en  $\text{Ba}^{2+}$  0.5 y 5 mM en la solución extracelular. En  $\text{Ba}^{2+}$  5 mM las corrientes entrantes a través del nAChR fueron mucho menores que las de las corrientes salientes. *B*, gráfico que muestra la relación entre las conductancias de cuerda en  $\text{Ba}^{2+}$  5 mM ( $G_{\text{Ba}5} = I_{\text{Ba}5} / V_m - E_{\text{rev}}$ ) con respecto a aquellas en  $\text{Ba}^{2+}$  0.5 mM ( $G_{\text{Ba}0.5} = I_{\text{Ba}0.5} / V_m - E_{\text{rev}}$ ) en función del potencial de membrana. El bloqueo por el  $\text{Ba}^{2+}$  fue más efectivo a potenciales hiperpolarizados que a despolarizados. La separación que se observa en el eje x corresponde a los puntos que están cerca de los potenciales de reversión de las corrientes a través del nAChR en  $\text{Ba}^{2+}$  0.5 y 5 mM que no fueron graficados. *C*, gráfico que muestra la relación entre las amplitudes de las corrientes a potenciales despolarizados (+43 mV) con respecto a aquellas a potenciales hiperpolarizados (-107 mV) en  $\text{Ba}^{2+}$  0.5 y 5 mM. Los valores representan la media  $\pm$  S.E.M. obtenidos en 12-14 CCI.

$30.3 \pm 1.9$  ms,  $n=52$  eventos, 6 células, *Figura 16A y B*). A  $-30$  mV, las corrientes sinápticas fueron salientes, con una amplitud media de  $33.2 \pm 1.7$  pA, un tiempo hasta alcanzar la amplitud máxima de  $12 \pm 0.6$  ms y un tiempo de decaimiento de  $31 \pm 1.6$  ms,  $n=40$  eventos, 2 células, *Figura 16A*. El  $E_{rev}$  de estas corrientes sinápticas fue de  $-66 \pm 1$  mV, un valor cercano al  $E_K$  y similar al obtenido para las corrientes activadas por la aplicación de la ACh en el baño (ver *Figura 9*).

Cuando las corrientes sinápticas se registraron con una pipeta conteniendo una solución con CsCl-BAPTA y se bañaron con una solución externa con  $Ca^{2+}$  0.5 mM más apamina 1 nM, las corrientes sinápticas fueron entrantes a  $-90$  mV y salientes a voltajes positivos ( $E_{rev} \approx -18$  mV). Este resultado coincide con lo observado para las corrientes colinérgicas aisladas, activadas por la aplicación de la ACh en el baño (ver *Figura 9A*). Se puede ver en la *Figura 16A* que en estas condiciones, no se detectaron corrientes sinápticas a  $-30$  mV. Esto se debe a que este potencial de membrana es cercano al  $E_{rev}$  para el nAChR y al mismo tiempo, muestra que las corrientes salientes a través del canal SK2 han sido efectivamente bloqueadas. La cinética de las corrientes sinápticas aisladas de los canales SK2, a  $-90$  mV, fue más rápida (tiempo al pico =  $4.5 \pm 0.5$  ms,  $\tau_{decaimiento} = 20.4 \pm 1.5$  ms,  $n=41$  eventos, 5 células; *Figura 16B y C*) que la de las corrientes combinadas. Este resultado es consistente con la observación de que el curso temporal de las corrientes post-sinápticas inhibitorias en las células ciliadas cocleares está gobernado por el *gating* del canal SK2 (Oliver *et al.*, 2000).

Para evaluar si el  $Ca^{2+}$  modula el curso temporal y/o la amplitud de las corrientes sinápticas aisladas del SK2, medimos estos parámetros en las CCIs a un potencial de membrana de  $-82$  mV (utilizando BAPTA en la pipeta y apamina en la solución extracelular) y bañando a las células con soluciones salinas conteniendo diferentes concentraciones de  $Ca^{2+}$ . Sólo pudimos analizar concentraciones de  $Ca^{2+} \geq 0.5$  mM, ya que, como la liberación de neurotransmisor depende del  $Ca^{2+}$ , a concentraciones bajas del mismo, la frecuencia de corrientes espontáneas fue muy baja como para ser evaluada. Como se ilustra en la *Figura 16E y F*, el incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  de 1.3 a 10 mM, provocó una reducción significativa (12 y 36 %, respectivamente) en la amplitud de las corrientes sinápticas con respecto a los valores obtenidos en  $Ca^{2+}$  0.5 mM. Las

amplitudes obtenidas fueron de  $-13.3 \pm 0.3$ ,  $-11.8 \pm 0.3$  y  $-8.6 \pm 0.1$  pA en  $\text{Ca}^{2+}$  0.5 (n=95 eventos, 5 células), 1.3 (n=106 eventos, 5 células,  $p < 0.001$ ) y 10 mM (n=791 eventos, 5 células,  $p < 0.001$ ), respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en los tiempos de decaimiento de las corrientes en las distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ :  $\tau_{\text{decaimiento}} = 19 \pm 0.8$ ,  $22 \pm 1$  y  $21 \pm 0.3$  ms para  $\text{Ca}^{2+}$  0.5, 1.3 y 10 mM (Figura 16G).

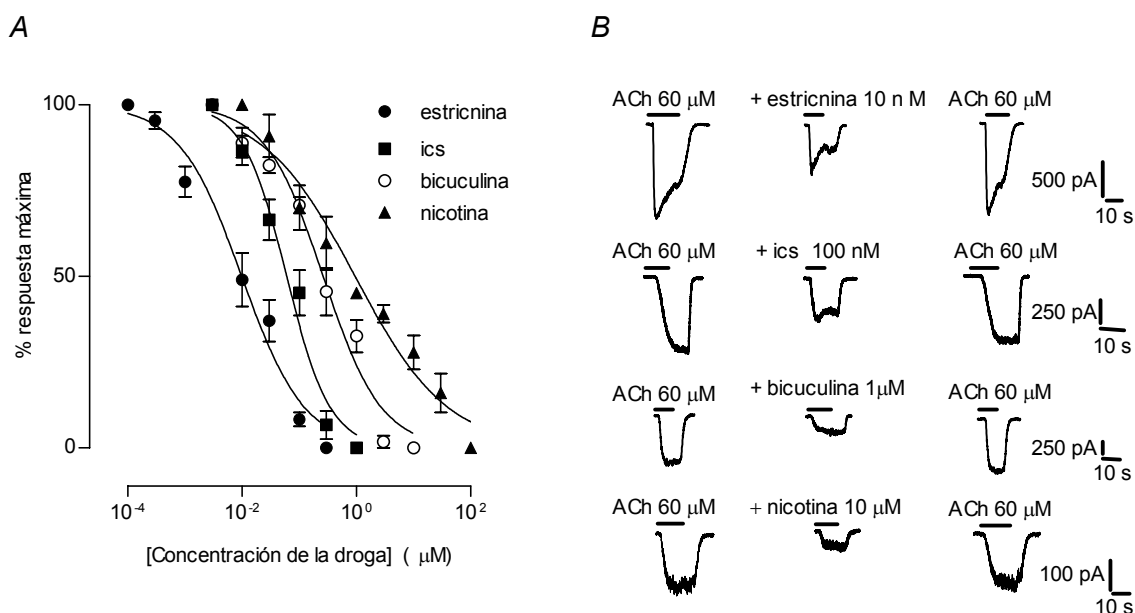


**Figura 16: Modulación por el  $\text{Ca}^{2+}$  de las corrientes sinápticas aisladas.** *A*, registros representativos de las corrientes sinápticas espontáneas combinadas (*nAChR* + *SK*) y aisladas (*nAChR*) a distintos potenciales de membrana. A  $-70$  mV la corriente mostró dos componentes: uno entrante, que se indica por una flecha, que corresponde a la corriente a través del *nAChR* y otro saliente, que corresponde a la corriente por el canal *SK2*. *B*, corriente sináptica aislada (en gris) y combinada (en negro) superpuestas. *C* y *D*, gráficos de barras que muestran el tiempo de decaimiento ( $\tau$ ) y las amplitudes, respectivamente, de las corrientes sinápticas combinadas (*nAChR* + *SK*) y aisladas (*nAChR*). Las amplitudes de las corrientes no fueron significativamente diferentes, mientras que los tiempos de decaimiento fueron más rápidos en las corrientes sinápticas aisladas. *E*, muestra el promedio de las corrientes sinápticas aisladas superpuestas, que se registraron en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  0.5 (en negro) y  $\text{Ca}^{2+}$  10 mM (en gris) en la solución extracelular. *F* y *G*, gráficos de barras que muestran las amplitudes y los tiempos de decaimiento, respectivamente, de las corrientes sinápticas aisladas, obtenidas en distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Las amplitudes de las corrientes se expresaron en valores absolutos.

*Perfil farmacológico del receptor nativo de las CCI.*

Estudiamos en las CCI el efecto de distintas drogas que bloquean a los receptores recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  (Elgoyhen *et al.*, 1994; Rothlin *et al.*, 1999; Verbitsky *et al.*, 2000; Elgoyhen *et al.*, 2001; McIntosh *et al.*, 2005; Ellison *et al.*, 2006) y al receptor nativo presente en las CCEs (Housley y Ashmore, 1991; Fuchs y Murrow, 1992a; Erostequi *et al.*, 1994a; Chen *et al.*, 1996; Dulon y Lenoir, 1996; McNiven *et al.*, 1996).

La nicotina es el agonista colinérgico típico de la familia de los nAChRs, excepto en el caso de los receptores recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$ , en los que se comporta como un antagonista (Elgoyhen *et al.*, 1994; Elgoyhen, 2001 #3980}. Cuando aplicamos nicotina en el baño, observamos que la misma no fue capaz de provocar ninguna respuesta. Sin embargo, cuando se aplicó junto con la ACh, se observó que esta droga bloqueaba las corrientes activadas por la ACh de manera reversible con una  $CI_{50}$  de  $1 \pm 0.1 \mu M$  (n=3-5 células) (*Figura 17*). Otra característica farmacológica de los receptores recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  es que son bloqueados por antagonistas de receptores no-colinérgicos tales como la estricnina (antagonista de los receptores de glicina), bicuculina (antagonista de los receptores de  $GABA_A$ ) e ICS-205,930 (antagonista de los receptores de serotonina) (Rothlin *et al.*, 1999; Elgoyhen *et al.*, 2001). En la *Figura 17A* se muestran las curvas de inhibición para estos tres compuestos. La estricnina bloqueó las respuestas activadas por la ACh en las CCI con una  $CI_{50}$  de  $8.6 \pm 0.8 nM$  (n=3-5 células). La  $CI_{50}$  para ICS-205,930 fue de  $59 \pm 4 nM$  (n=4 células), mientras que para la bicuculina fue de  $0.3 \pm 0.02 \mu M$  (n=3-5 células). El efecto de estas drogas sobre el nAChR fue completamente reversible luego de lavar a la preparación con una solución salina normal durante 1 minuto (*Figura 17B*).

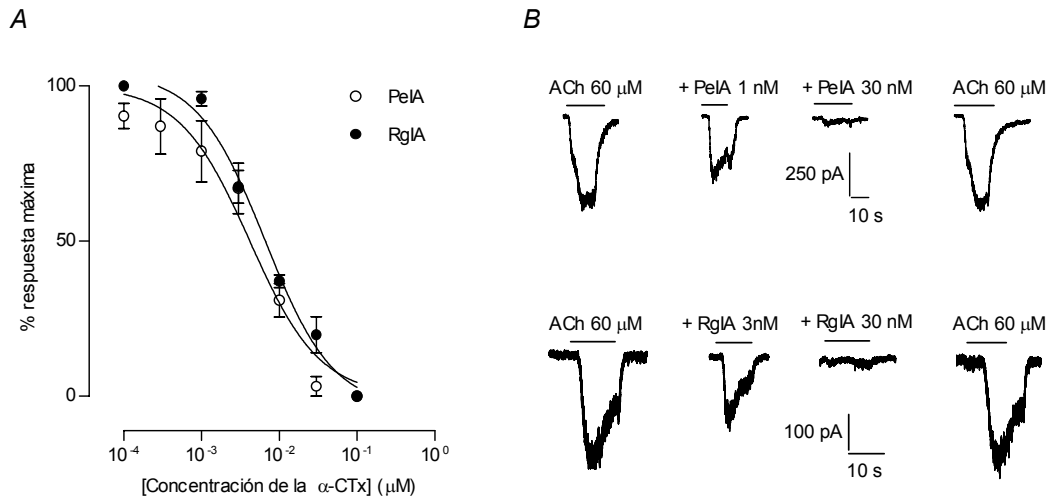


**Figura 17: Perfil farmacológico del nAChR nativo de las CCIIs.** *A*, curvas de inhibición en presencia de diferentes antagonistas: estericina ( $CI_{50}$ :  $8.6 \pm 0.8$  nM;  $n_H$ :  $0.65 \pm 0.1$ ), ICS-205,930 ( $CI_{50}$ :  $59 \pm 4$  nM;  $n_H$ :  $1.2 \pm 0.2$ ), bicuculina ( $CI_{50}$ :  $0.3 \pm 0.02$  μM;  $n_H$ :  $0.9 \pm 0.1$ ) y nicotina ( $CI_{50}$ :  $1 \pm 0.1$  μM;  $n_H$ :  $0.5 \pm 0.1$ ). Las respuestas se normalizaron a las obtenidas con ACh 60 μM en ausencia del antagonista. *B*, registros representativos de las corrientes aisladas (*nAChR*) activadas por la aplicación de ACh 60 μM en presencia y en ausencia de los distintos antagonistas. En todos los casos, el efecto del antagonista se pudo revertir completamente lavando a las células con una solución salina normal sin el antagonista durante 1 minuto. Los datos son representativos de 3-6 células sostenidas a un potencial de membrana de  $-90$ mV.

Finalmente y continuando con la caracterización farmacológica de este receptor, estudiamos el efecto de dos toxinas peptídicas sintéticas, PeIA y RgIA, las cuales pertenecen a la familia de las  $\alpha$ -conotoxinas ( $\alpha$ -CTx) (McIntosh *et al.*, 2005; Ellison *et al.*, 2006). Las  $\alpha$ -CTx son muy usadas como herramientas farmacológicas para caracterizar a los nAChRs neuronales. Se ha observado que estas dos toxinas son inhibidores muy potentes y específicos de los nAChRs recombinantes  $\alpha 9\alpha 10$  (McIntosh *et al.*, 2005; Ellison *et al.*, 2006). En la *Figura 18* se muestra que las  $\alpha$ -CTx PeIA y RgIA bloquearon las corrientes activadas por la ACh en las CCIIs. El efecto de estas  $\alpha$ -CTx sobre el nAChR nativo fue completamente reversible luego de lavar la preparación con una solución salina normal durante 1 minuto (*Figura 18*). La concentración de  $\alpha$ -CTx



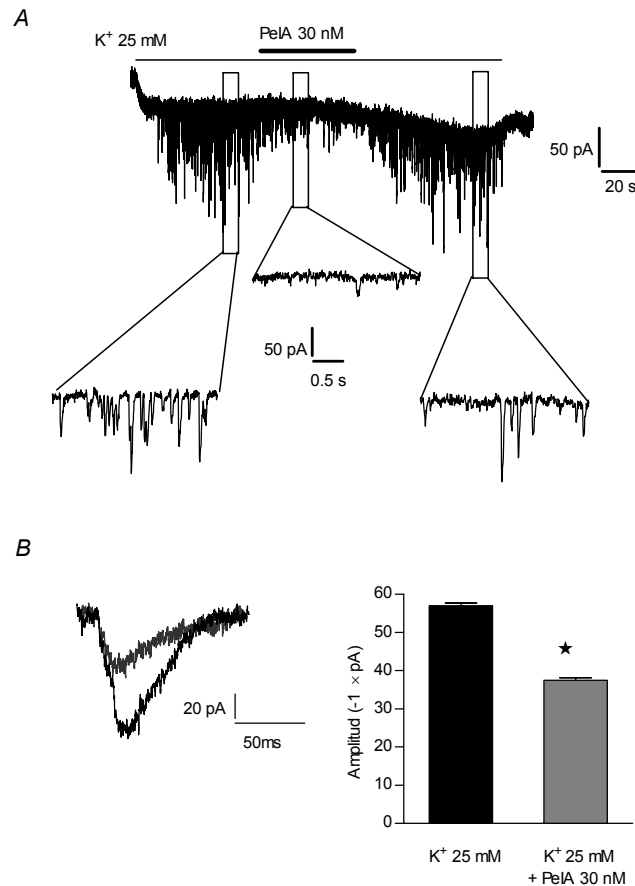
PeIA requerida para bloquear el 50 % de la respuesta a ACh 60  $\mu\text{M}$  ( $\text{CI}_{50}$ ), fue de  $4.4 \pm 0.5$  nM, con un coeficiente de Hill ( $n_H$ ) de  $1.0 \pm 0.1$  ( $n=4-6$  células), mientras que la  $\text{CI}_{50}$  para la  $\alpha\text{-CTx RgIA}$  fue de  $6.6 \pm 0.6$  nM, con un  $n_H$  de  $1.0 \pm 0.2$  ( $n=4-5$  células). Estos valores de  $\text{CI}_{50}$  son similares a los observados para el nAChR recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  expresado en oocitos de *Xenopus laevis*, 6.9 y 5.1 nM, respectivamente (McIntosh *et al.*, 2005).



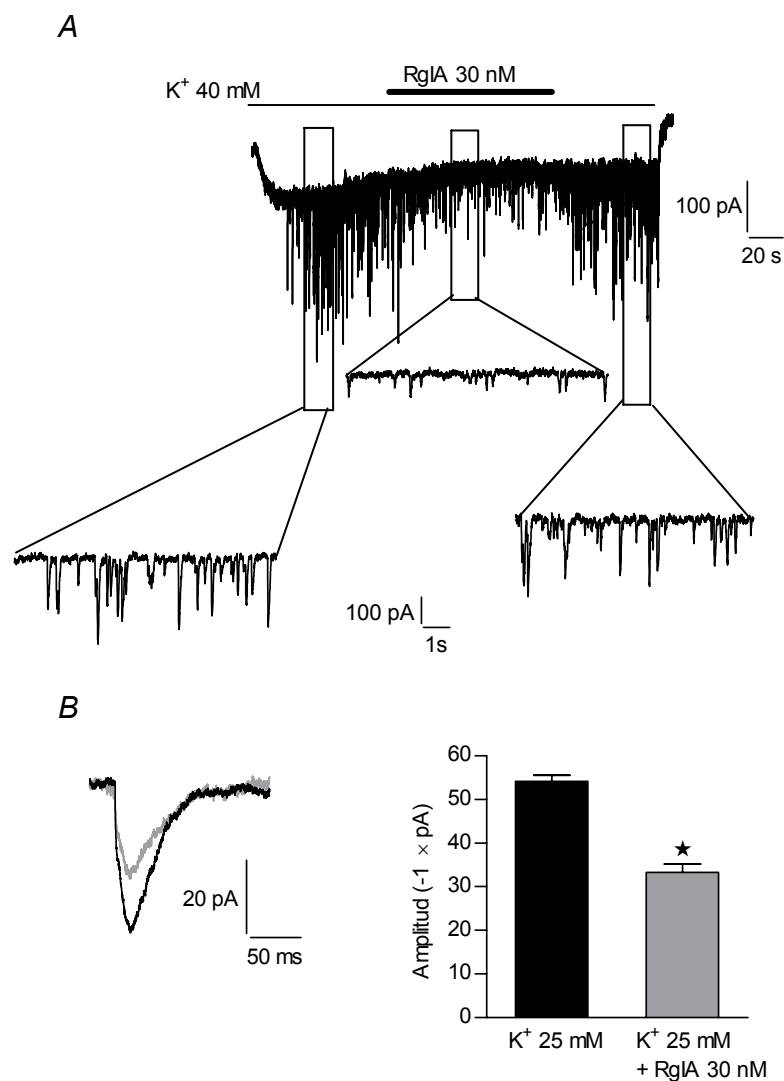
**Figura 18: Efecto de las  $\alpha\text{-CTx}$  PeIA y RgIA sobre las corrientes activadas por la ACh en las CCIIs.** *A*, curvas de inhibición que resultaron de la aplicación de ACh 60  $\mu\text{M}$  con concentraciones crecientes de las  $\alpha\text{-CTx}$  PeIA y RgIA. Se preincubaron las células con las distintas concentraciones de las toxinas durante 10 minutos previo a la aplicación del agonista. Las amplitudes de las corrientes activadas por la ACh en presencia de las distintas concentraciones de las  $\alpha\text{-CTx}$  fueron normalizadas a los valores obtenidos en ausencia de las mismas. El valor de  $\text{CI}_{50}$  para la  $\alpha\text{-CTx}$  PeIA fue de  $4.4 \pm 0.5$  nM,  $n_H = 1.0 \pm 0.1$ , mientras que para la  $\alpha\text{-CTx}$  RgIA fue de  $6.6 \pm 0.6$  nM,  $n_H = 1.0 \pm 0.2$ . Se promediaron los valores obtenidos en 4 a 6 CCIIs. *B*, registros representativos de las respuestas inducidas por la aplicación de ACh 60  $\mu\text{M}$  tanto en presencia como en ausencia de distintas concentraciones de las  $\alpha\text{-CTx}$  PeIA y RgIA. Todos los experimentos se llevaron a cabo en CCIIs sostenidas a un potencial de membrana de  $-90$  mV. La solución intracelular de la pipeta contenía K-BAPTA y la extracelular apamina 1nM para prevenir la activación del canal SK2.

Las condiciones fisiológicas de la neurotransmisión *in vivo*, difieren notablemente de la aplicación de ACh en la solución que baña a la preparación del órgano de Corti. El neurotransmisor que se libera en la brecha sináptica, se encuentra muy próximo a los receptores post-sinápticos y alcanza una concentración en el rango milimolar, que es suficiente para activar en el orden de los milisegundos a los receptores post-sinápticos (Le Novère *et al.*, 2002). Debido a esto, estudiamos el efecto de las  $\alpha$ -CTx PeIA y RgIA sobre las corrientes sinápticas combinadas (*nAChR* + *SK*), activadas por la liberación pre-sináptica de la ACh en presencia de altas concentraciones de  $K^+$ . Al elevar la concentración de  $K^+$  extracelular, se despolarizan los terminales eferentes, activándose así los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes del voltaje presentes en el terminal pre-sináptico. Como la liberación de neurotransmisor depende de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, al despolarizar con alto  $K^+$ , se acelera la liberación (Llinas *et al.*, 1981; Augustine y Charlton, 1986). Como se muestra en las Figuras 19 y 20, las corrientes sinápticas fueron bloqueadas por las  $\alpha$ -CTx PeIA y RgIA, lo que indica que ambas toxinas son herramientas valiosas para estudiar las respuestas mediadas por el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  en condiciones más fisiológicas. En la Figura 19A se observan las corrientes sinápticas provocadas por la despolarización de los terminales eferentes con alto  $K^+$  tanto en presencia como en ausencia de la  $\alpha$ -CTx PeIA. La  $\alpha$ -CTx PeIA redujo la amplitud de las corrientes sinápticas de  $-57.0 \pm 0.7$  pA (997 eventos, 3 células) a  $-37.5 \pm 0.7$  pA, (766 eventos, 3 células),  $p < 0.0001$  (Figura 19B); lo que muestra que la toxina ejerce un efecto post-sináptico. El bloqueo por esta toxina fue rápidamente reversible luego de lavar a la preparación con la solución salina conteniendo KCl 25 mM. Esto es consistente con el efecto inhibitorio sobre la amplitud de las corrientes activadas por la aplicación de ACh exógena. Además, se observó una reducción en la frecuencia de eventos en presencia de la toxina, de  $2.2 \pm 0.5$  a  $1.2 \pm 0.2$  Hz. Esta reducción en la frecuencia puede deberse a que los eventos sinápticos de menor amplitud se redujeron aún más por el efecto de la toxina y por ende no pudieron ser resueltos dentro del ruido de los registros de *whole-cell* o a un efecto pre-sináptico adicional de la misma. La Figura 20A muestra que las corrientes sinápticas activadas por la despolarización de los terminales eferentes con  $K^+$  40 mM, fueron bloqueadas por la  $\alpha$ -CTx RgIA en una concentración de 30 nM. El bloqueo por la

toxina fue rápidamente reversible luego de lavar a la preparación con la solución salina conteniendo  $K^+$  40 mM. La  $\alpha$ -CTx RgIA redujo la amplitud de las corrientes sinápticas activadas por  $K^+$  25 mM de  $-54.2 \pm 1.4$  pA (363 eventos, 5 células), a  $-33.4 \pm 1.9$  pA (107 eventos, 5 células),  $p < 0.0001$  (Figura 20B). En este caso, no observamos una reducción en la frecuencia de eventos en presencia de la  $\alpha$ -CTx RgIA ( $0.31 \pm 0.06$  a  $0.22 \pm 0.06$  Hz,  $p=0.3$ ), lo que estaría indicando que esta toxina sólo ejerce un efecto post-sináptico.



**Figura 19: Efecto de la  $\alpha$ -CTx PeIA sobre las corrientes sinápticas.** A, registros representativos que ilustran el efecto de la aplicación de la  $\alpha$ -CTx PeIA 30 nM sobre las corrientes sinápticas activadas por la despolarización de los terminales pre-sinápticos con KCl 25 mM. Los recuadros muestran las corrientes sinápticas correspondientes al registro superior graficadas en una escala de tiempo más lenta. B, izquierda: corrientes sinápticas superpuestas activadas por KCl 25 mM tanto en presencia (en gris) como en ausencia (en negro) de la  $\alpha$ -CTx PeIA 30 nM. Derecha: diagrama de barras que ilustra el efecto de la  $\alpha$ -CTx PeIA 30 nM sobre la amplitud de las corrientes sinápticas. Los registros corresponden a 3 CCI's independientes y se analizaron 997 y 766 eventos, tanto en ausencia como en presencia de  $\alpha$ -CTx PeIA, respectivamente. La estrella en el gráfico de barras indica una diferencia significativa,  $p < 0.0001$ . Las amplitudes de las corrientes sinápticas se expresaron en valores absolutos. En todos los casos la solución intracelular contenía KCl-EGTA.



**Figura 20: Efecto de la  $\alpha$ -CTx RgIA sobre las corrientes sinápticas de las CCI.** *A*, registros representativos que ilustran el efecto de la aplicación de la  $\alpha$ -CTx RgIA 30 nM sobre las corrientes sinápticas activadas por la despolarización de los terminales pre-sinápticos con KCl 40 mM. Los recuadros muestran las corrientes sinápticas correspondientes al registro superior graficadas en una escala de tiempo más lenta. *B*, izquierda: corrientes sinápticas superpuestas activadas por KCl 25 mM tanto en presencia (en gris) como en ausencia (en negro) de la  $\alpha$ -CTx RgIA 30 nM. Derecha: diagrama de barras que ilustra el efecto de la  $\alpha$ -CTx RgIA 30 nM sobre la amplitud de las corrientes sinápticas activadas por KCl 25 mM. Los registros corresponden a 5 CCI independientes y se analizaron 363 y 107 eventos, tanto en ausencia como en presencia de  $\alpha$ -CTx PeIA, respectivamente. La estrella en el gráfico de barras indica una diferencia significativa,  $p < 0.0001$ . Las amplitudes de las corrientes sinápticas se expresaron en valores absolutos. En todos los casos la solución intracelular de la pipeta contenía KCl-EGTA.

## Discusión

Esta parte del trabajo consistió en realizar una extensa caracterización biofísica y farmacológica del receptor que media la sinapsis entre las fibras eferentes olivococleares y las CCIs antes del comienzo de la audición. Aunque es una sinapsis transitoria, presente en las CCIs en estadios inmaduros del desarrollo coclear, es funcional desde al menos P3 hasta P13-14 (Glowatzki y Fuchs, 2000; Katz *et al.*, 2004 y ver Parte II de esta tesis). Al igual que en las CCEs (Fuchs y Murrow, 1992a, b; Doi y Ohmori, 1993; Blanchet *et al.*, 1996; Dulon y Lenoir, 1996; Evans, 1996; Fuchs, 1996; Nenov *et al.*, 1996b; Dulon *et al.*, 1998; Oliver *et al.*, 2000), se ha postulado que estaría mediada por un nAChR compuesto por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  (Glowatzki y Fuchs, 2000). Los resultados obtenidos en este apartado nos permiten concluir que el receptor de las CCIs es un heterómero  $\alpha 9\alpha 10$  y no un homómero  $\alpha 9$ .

La caracterización del nAChR nativo de las CCIs fue realizada aisándolo del canal SK2 asociado, para poder comparar sus propiedades con aquellas obtenidas para los receptores recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  expresados en oocitos de *Xenopus laevis*. El perfil farmacológico y la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor nativo fueron idénticos a los descritos para los receptores recombinantes tanto  $\alpha 9$  como  $\alpha 9\alpha 10$  (Elgoyhen *et al.*, 1994; Katz *et al.*, 2000; Elgoyhen *et al.*, 2001; Weisstaub *et al.*, 2002; McIntosh *et al.*, 2005; Ellison *et al.*, 2006). Sin embargo, cuando se compararon otras características biofísicas, se observó que el receptor nativo de las CCIs se parece más al nAChR recombinante heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  (Elgoyhen *et al.*, 2001; Weisstaub *et al.*, 2002). En particular, tanto el receptor nativo, como el recombinante heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ , presentan dos sitios de acción del  $\text{Ca}^{2+}$ . Un sitio probablemente extracelular, que facilitaría la activación del canal por el ligando, está presente tanto en el receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  y nativo de las CCIs, pero ausente en el homomérico  $\alpha 9$ . En contraste, tanto el receptor nativo como el homomérico  $\alpha 9$  y el heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ , comparten la propiedad de ser bloqueados por cationes divalentes en concentraciones dentro del rango fisiológico (Katz *et al.*, 2000; Elgoyhen *et al.*, 2001; Weisstaub *et al.*, 2002). Más aún, el patrón de desensibilización del receptor nativo de las CCIs y la relación de corriente en función del

potencial fueron semejantes a las reportadas para el receptor recombinante heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  (Elgoyhen *et al.*, 2001).

*Sensibilidad al voltaje y patrón de desensibilización del receptor nativo de las CCI.*

El potencial de reversión y la sensibilidad al voltaje de las corrientes colinérgicas aisladas son consistentes con los reportados para el receptor recombinante heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  expresado en oocitos de *Xenopus laevis* (Elgoyhen *et al.*, 2001; Weisstaub *et al.*, 2002) y para las corrientes activadas por la ACh en CCEs aisladas de cobayos adultos (Blanchet *et al.*, 1996), CCEs de ratas en desarrollo (Dulon y Lenoir, 1996), células ciliadas cortas de pollo (McNiven *et al.*, 1996) y CCI de ratas en desarrollo (Glowatzki y Fuchs, 2000). La curva *I-V* del nAChR nativo presenta, como aquella del receptor recombinante  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$ , una considerable rectificación alrededor del potencial de reversión. Sin embargo, a concentraciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (1.3 mM), esta *I-V* difiere de la obtenida para el receptor homomérico  $\alpha 9$ , principalmente por el hecho de que el receptor nativo y el heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ , tienen conductancias significativas a potenciales hiperpolarizados. Esta diferencia podría deberse al hecho de que el  $\text{Ca}^{2+}$  sólo bloquea al nAChR homomérico  $\alpha 9$  mientras que este catión divalente produce un efecto bifásico sobre el receptor nativo y el heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  dentro del mismo rango de concentraciones fisiológicas: hasta una concentración de 0.5 mM, predomina la potenciación, mientras que a concentraciones mayores, el bloqueo comienza a ser aparente. El bloqueo a concentraciones altas de divalentes se evidencia por el hecho de que la curva *I-V* en presencia de  $\text{Ba}^{2+}$  5 mM tiene la misma forma (rectificación saliente) que la reportada para el receptor recombinante homomérico  $\alpha 9$  en  $\text{Ca}^{2+}$  1.8 mM (Katz *et al.*, 2000; Elgoyhen *et al.*, 2001). Una rectificación saliente similar se observa con el receptor recombinante heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  luego de elevar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a 3 mM (Weisstaub *et al.*, 2002).

Muchos canales dependientes de ligando sufren un proceso de desensibilización ante la aplicación del agonista, ya sea en forma breve, prolongada o intermitente (Jones y Westbrook, 1996). En los nAChRs se demostró que el grado de desensibilización que sufren estos receptores se altera dependiendo de la composición de subunidades (Fenster

*et al.*, 1997; Gerzanich *et al.*, 1998). Consistente con esta observación, se demostró que el canal recombinante homomérico  $\alpha 9$  no se desensibiliza ante la aplicación continua o intermitente de una concentración saturante de ACh, mientras que las corrientes a través del receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  decaen en ambas situaciones experimentales (Elgoyhen *et al.*, 2001). Asimismo, las respuestas colinérgicas en las CCEs de mamíferos también se desensibilizan en presencia del agonista (Blanchet *et al.*, 1996; Dulon y Lenoir, 1996; Evans, 1996; Nenov *et al.*, 1996a). En este trabajo demostramos que el receptor nativo de las CCIIs se desensibiliza cuando se lo expone a una concentración saturante de ACh de manera similar al receptor heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  difiriendo de lo reportado para el receptor homomérico  $\alpha 9$ .

#### *Permeabilidad al calcio del receptor nativo de las CCIIs.*

Los canales activados por ligando constituyen una vía muy importante para la entrada de calcio a las células a voltajes cercanos a su potencial de reposo. Se ha mostrado que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los nAChRs estaría involucrada en la modulación de la liberación de neurotransmisor en el sistema nervioso central (Role y Berg, 1996) y en la activación de conductancias secundarias dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . La inhibición colinérgica en las células ciliadas de la cóclea se debe a la activación de canales de  $\text{K}^+$  sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  por un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático (Fuchs, 1996; Glowatzki y Fuchs, 2000; Oliver *et al.*, 2000). En este estudio mostramos que el receptor nativo de las CCIIs tiene una permeabilidad para el  $\text{Ca}^{2+}$  relativa al  $\text{Na}^+$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ ) de 8. Este valor de permeabilidad es similar al reportado para los receptores recombinantes homoméricos  $\alpha 9$  y heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$  (Katz *et al.*, 2000; Weisstaub *et al.*, 2002; Fucile *et al.*, 2006) y también está en el mismo rango que el reportado para los nAChRs homoméricos  $\alpha 7$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \approx 10-20$ ) (Bertrand *et al.*, 1990; Sands y Barish, 1991; Séguéla *et al.*, 1993), que es el más alto entre todos los nAChRs. El valor de  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  de este grupo de nAChRs es similar al de otros canales activados por ligando con una alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , como los receptores de NMDA y los canales activados por nucleótidos cíclicos (Mayer y Westbrook, 1987; Frings, 1997).

Para calcular el valor de  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ , se ajustaron los datos de los  $E_{\text{rev}}$  de las corrientes en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, utilizando la ecuación de voltaje de

campo constante de Hodgkin-Goldman-Katz (GHK), ampliada para incluir cationes divalentes (Jan y Jan, 1976). Sin embargo, debe recordarse, que el  $\text{Ca}^{2+}$  bloquea las corrientes totales, compuestas por  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , a través del nAChR nativo de las CCI. Esta interacción estaría violando el principio de independencia iónica que se asume en GHK. De esta manera, el valor de permeabilidad obtenido debe tomarse sólo como una estimación para compararlo con los valores reportados para los receptores recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  (Katz *et al.*, 2000; Elgoyhen *et al.*, 2001; Sgard *et al.*, 2002; Weisstaub *et al.*, 2002) y con otros canales activados por ligando recombinantes y nativos. El alto valor de permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor nativo obtenido en el presente trabajo es consistente con su función fisiológica, que es la de servir como una vía de entrada de calcio a las células, más que como un mecanismo de despolarización debido a la entrada de  $\text{Na}^+$ . Este resultado concuerda con trabajos previos en células ciliadas cortas de pollo (Fuchs y Murrow, 1992b; McNiven *et al.*, 1996) y en CCEs de roedores (Blanchet *et al.*, 1996) en los cuales se han mostrado evidencias de que el receptor de las células ciliadas tendría una considerable permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### *Efecto de los cationes divalentes sobre el receptor nativo de las CCI.*

Como se describió anteriormente, el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel fundamental en la fisiología de las células ciliadas de la cóclea, cumpliendo un papel de efector o de modulador en varios procesos fisiológicos (Jaramillo, 1995). La modulación por el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, el cual puede presentar grandes variaciones en su concentración durante una actividad sináptica intensa (Brown *et al.*, 1995), es una característica común entre los nAChRs tanto recombinantes como nativos. El efecto que el  $\text{Ca}^{2+}$  ejerce sobre el receptor nativo de las CCI es similar al descrito para el receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$ , en donde el  $\text{Ca}^{2+}$  potencia las respuestas inducidas por la aplicación de ACh en concentraciones micromolares y las bloquea a concentraciones mayores a 0.5 mM (Weisstaub *et al.*, 2002). Los estudios en células ciliadas cortas de pollo mostraron que el receptor colinérgico de estas células es también modulado de manera bifásica por el  $\text{Ca}^{2+}$ , pero el rango de concentraciones en las que se observa dicha modulación es significativamente mayor (McNiven *et al.*, 1996). En las CCEs de mamíferos aisladas, cargadas con BAPTA, se observó una reducción en las corrientes activadas por la ACh en una solución



sin  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto a un potencial de membrana de +32 mV como a -81 mV (Blanchet *et al.*, 1996). Sin embargo, en estos experimentos el  $\text{Ca}^{2+}$  había sido reemplazado por el  $\text{Mg}^{2+}$ , el cual bloquea al receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  (Weisstaub *et al.*, 2002) y como mostramos en el presente trabajo, al receptor nativo de las CCI. Un efecto bifásico similar del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el receptor nativo de las CCI fue reportado por (Marcotti *et al.*, 2004), pero en este estudio se evaluó la corriente colinérgica acoplada a la corriente a través del SK2. Sin embargo, aunque los resultados fueron cualitativamente similares, la interpretación está restringida por una complejidad adicional, ya que la activación del canal SK2 depende del  $\text{Ca}^{2+}$ .

Con el fin de evaluar cuál es el efecto del  $\text{Ba}^{2+}$  sobre el receptor nativo de las CCI, estudiamos las corrientes activadas por la aplicación de ACh en presencia de distintas concentraciones de  $\text{Ba}^{2+}$  extracelular. Como se describió para el receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  (Weisstaub *et al.*, 2002) y para otros nAChRs (Ifune y Steinbach, 1991; Mulle *et al.*, 1992a; Booker *et al.*, 1998; Liu y Berg, 1999), el  $\text{Ba}^{2+}$  es capaz de reemplazar al  $\text{Ca}^{2+}$  en sus efectos sobre el receptor nativo. Observamos que el  $\text{Ba}^{2+}$  potenció y bloqueó las respuestas activadas por la ACh del receptor nativo de las CCI. Estos efectos del  $\text{Ba}^{2+}$  sobre las corrientes colinérgicas han sido estudiados previamente en CCEs de cobayos (Erostequi *et al.*, 1994b). Sin embargo, en este caso, los autores no vieron corrientes activadas por la ACh cuando reemplazaron el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular por el  $\text{Ba}^{2+}$ . La causa de esta discrepancia con nuestros resultados podría deberse a que: (1) ellos estaban estudiando las corrientes combinadas (*nAChR* + *SK*) y evaluaron los efectos del  $\text{Ba}^{2+}$  a un potencial de membrana de 0 mV, que es cercano al potencial de reversión de las corrientes a través del nAChR y (2) el  $\text{Ba}^{2+}$  no solo no activa a los canales SK2 sino que los bloquea (Soh y Park, 2001), haciéndose despreciable de esta manera, la corriente saliente a través del canal SK2.

Con el objetivo de evaluar si el  $\text{Mg}^{2+}$ , al igual que el  $\text{Ba}^{2+}$  era capaz de reemplazar al  $\text{Ca}^{2+}$  en su acción moduladora sobre el receptor nativo, se realizaron ensayos en los cuales se reemplazó totalmente al  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular por  $\text{Mg}^{2+}$ . En estas condiciones se observó que, al igual que en otros receptores nicotínicos (Mulle *et al.*, 1992a; Galzi *et al.*, 1996), así como también en el nAChR de las CCEs (Nenov *et al.*, 1996b), el  $\text{Mg}^{2+}$  fue incapaz de producir el efecto potenciador descrito para el  $\text{Ca}^{2+}$ . El

Mg<sup>2+</sup> a concentraciones fisiológicas, bloqueó al nAChR nativo de las CCI. Por lo tanto, los efectos de la activación eferente olivococlear sobre las CCI dependen no sólo de la concentración de Ca<sup>2+</sup> extracelular, sino de la relación Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> en la perilinfa. Como se ha postulado para el nAChR  $\alpha$ 7, una posible explicación para esta diferencia de acción entre estos cationes divalentes podría deberse a que el Mg<sup>2+</sup> tiene un menor radio metálico (150 pm) que el Ca<sup>2+</sup> o el Ba<sup>2+</sup> (180 y 215 pm, respectivamente). Entonces, como la densidad de carga del Mg<sup>2+</sup> es mayor que la del Ca<sup>2+</sup> o el Ba<sup>2+</sup>, la interacción del Mg<sup>2+</sup> con las moléculas de H<sub>2</sub>O sería más fuerte resultando en un mayor radio de hidratación y una velocidad de deshidratación más lenta, lo que podría llevar a prevenir la interacción de este catión con los sitios involucrados en la potenciación (Eddins *et al.*, 2002).

*El calcio modula las corrientes sinápticas a través del nAChR.*

Los efectos moduladores del Ca<sup>2+</sup> fueron también observados en las corrientes sinápticas espontáneas que resultan de la liberación de la ACh de los terminales eferentes que contactan a las CCI previo al comienzo de la audición. Al elevar la concentración de Ca<sup>2+</sup> de 0.5 a 1.3 y 10 mM, se observó una disminución en la amplitud de las corrientes sinápticas sin ningún efecto significativo en el curso temporal de estas corrientes. La reducción en la amplitud de las corrientes sinápticas está de acuerdo con el efecto observado sobre las corrientes activadas por la aplicación de la ACh de manera exógena. El efecto del Ca<sup>2+</sup> sobre la amplitud de las corrientes y no sobre su curso temporal sugiere que el bloqueo podría deberse a que el Ca<sup>2+</sup> al permear a través del canal estaría interrumpiendo el flujo de Na<sup>+</sup> (Decker y Dani, 1990; Mülle *et al.*, 1992a, b; Katz *et al.*, 2000; Weisstaub *et al.*, 2002). De esta manera, el bloqueo por el Ca<sup>2+</sup> estaría afectando la conductancia de los canales sin producir algún efecto sobre la cinética. Los efectos de potenciación por el Ca<sup>2+</sup> sobre el receptor nativo de las CCI y sobre el receptor recombinante  $\alpha$ 9 $\alpha$ 10 son observados a concentraciones muy bajas de Ca<sup>2+</sup> (0-0.5 mM) (Weisstaub *et al.*, 2002). Por esta razón no fue posible estudiar el efecto de potenciación sobre las corrientes sinápticas, ya que en ausencia de Ca<sup>2+</sup> el número de eventos fue extremadamente bajo.

*Mecanismo de potenciación y bloqueo por iones divalentes.*

Se ha postulado para otros nAChRs que la potenciación por el  $\text{Ca}^{2+}$  se debe a un efecto alostérico que este catión ejerce sobre un sitio extracelular (Decker y Dani, 1990; Mulle *et al.*, 1992a; Vernino *et al.*, 1992; Galzi *et al.*, 1996) y que esta potenciación es independiente del potencial de membrana y de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula (Mulle *et al.*, 1992a; Vernino *et al.*, 1992; Weisstaub *et al.*, 2002). En el nAChR de las células ciliadas se observó potenciación de las respuestas aún en presencia del quelante rápido de  $\text{Ca}^{2+}$ , BAPTA, en la solución intracelular, lo cual descartaría un efecto intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$ . En estudios realizados para otros nAChRs se vio que la potenciación por el  $\text{Ca}^{2+}$  se debía a un aumento en la afinidad aparente por el agonista (Mulle *et al.*, 1992a; Vernino *et al.*, 1992). En el presente trabajo se evaluó si el valor de  $\text{CE}_{50}$  cambiaba al variar las concentraciones extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  entre 0 y 0.5 mM, con el fin de determinar si había cambios en la afinidad aparente de la ACh por el receptor nativo, asociados a la potenciación de las corrientes. Cuando se realizó la curva de concentración-respuesta para la ACh en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución extracelular, se obtuvo un valor de  $\text{CE}_{50}$  casi 3 veces mayor que para una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de 0.5 mM. Si bien se produjo un corrimiento en el valor de  $\text{CE}_{50}$  para las distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , no se observaron diferencias significativas en el valor máximo alcanzado. Estos resultados sugieren que, en presencia de concentraciones de ACh no saturantes, el  $\text{Ca}^{2+}$  sería necesario para la activación del canal. Un cambio en la afinidad aparente podría implicar cambios en la unión del agonista a su sitio de acción, en la cooperatividad del sistema, en el acoplamiento entre la unión del agonista y la apertura del canal y/o cambios en las propiedades cinéticas de estos receptores. Un aumento en la unión del agonista sería menos probable ya que se ha reportado que el  $\text{Ca}^{2+}$  es un inhibidor competitivo del nAChR del *Torpedo* en un rango de concentraciones de 0.1 a 1 mM. En consecuencia, un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  de 0 a 0.5 mM podría llevar a una disminución en la unión del agonista a su sitio de acción (Chang y Neumann, 1976). Se han encontrado cambios en la cooperatividad de la unión de la ACh al nAChR cuando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular varían en neuronas de hipocampo (Bonfante-Cabarcas *et al.*, 1996), sin embargo, nosotros no encontramos diferencias significativas en los coeficientes de Hill de las curvas de concentración-respuesta para la ACh obtenidas en presencia y en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . En

otros nAChRs se han reportado cambios en las propiedades cinéticas debido al aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, que llevan a un incremento en la probabilidad o frecuencia de apertura del canal (Mulle *et al.*, 1992a; Amador y Dani, 1995). Sin embargo, para probar esta hipótesis, se requerirían estudios de canales unitarios. Observamos que la concentración de agonista requerida para obtener la respuesta máxima es la misma para las dos concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  estudiadas. Esto sugiere que la apertura del canal a altas concentraciones de ACh sería independiente de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular.

El hecho de que el bloqueo por el  $\text{Ba}^{2+}$  sea dependiente del potencial de membrana sugiere, como se ha observado para el receptor recombinante homomérico  $\alpha 9$  y heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  (Katz *et al.*, 2000; Weisstaub *et al.*, 2002), que el sitio de acción del  $\text{Ca}^{2+}$  o del  $\text{Ba}^{2+}$  estaría dentro del poro del canal e involucraría una obstrucción del flujo de cationes monovalentes con la consecuente reducción de la corriente total. Esta interpretación también ha sido sugerida para los nAChRs neuronales, para el nAChR muscular (Decker y Dani, 1990; Mulle *et al.*, 1992a, b) y para otros canales activados por ligando y receptores mecanosensoriales (Frings *et al.*, 1995; Ricci y Fettiplace, 1998). Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que el bloqueo es un fenómeno que ocurre a nivel de la conductancia unitaria mientras que la potenciación estaría relacionada con cambios en la afinidad aparente del receptor por el agonista.

#### *Perfil farmacológico del nAChR nativo de las CCI.*

La farmacología de los receptores nicotínicos presentes en la sinapsis olivococlear-CCEs es tan peculiar que, previo al clonado y caracterización de la subunidad nicotínica  $\alpha 9$ , ninguno de los receptores nicotínicos recombinantes existentes hasta ese momento reunía las características necesarias para ser el candidato adecuado (ErosteGUI *et al.*, 1994a; Chen *et al.*, 1996). Desde el clonado de  $\alpha 9$  y posteriormente el de  $\alpha 10$  (Elgoyhen *et al.*, 1994; Elgoyhen *et al.*, 2001), una serie de experimentos de RT-PCR e hibridización *in situ*, los cuales localizaron transcritos de  $\alpha 9$  y de  $\alpha 10$  en las células ciliadas cocleares (Elgoyhen *et al.*, 1994; Glowatzki *et al.*, 1995; Hiel *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1998a; Morley *et al.*, 1998; Simmons y Morley, 1998; Elgoyhen *et al.*, 2001), así como una extensa caracterización biofísica y farmacológica de

los receptores nicotínicos recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  (Katz *et al.*, 2000; Rothlin *et al.*, 1999; Verbitsky *et al.*, 2000; Weisstaub *et al.*, 2002) y la generación de un ratón con una mutación nula para el gen que codifica para la subunidad  $\alpha 9$  (Vetter *et al.*, 1999), proveyeron una combinación de datos lo suficientemente sólidos como para proponer que las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  son componentes esenciales del receptor colinérgico de las células ciliadas externas.

Las características farmacológicas del receptor nativo de las CCI's son similares a aquellas obtenidas para los receptores recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  expresados en oocitos de *Xenopus laevis* (Elgoyhen *et al.*, 1994; Rothlin *et al.*, 1999; Elgoyhen *et al.*, 2001; McIntosh *et al.*, 2005; Ellison *et al.*, 2006) y también a aquellas obtenidas para el receptor colinérgico nativo de las CCE's (Eróstegui *et al.*, 1994a; Chen *et al.*, 1996). Las propiedades farmacológicas obtenidas para el receptor nativo de las CCI's se resumen en la *Tabla 2*, en donde además se comparan con la de los receptores recombinantes homoméricos  $\alpha 9$ , heteroméricos  $\alpha 9\alpha 10$  y los receptores nativos de las CCE's.

El nAChR nativo de las CCI's es bloqueado por la nicotina, agonista colinérgico clásico de la familia de los nAChRs, así como también por antagonistas no-colinérgicos como la estricnina, antagonista de los receptores de glicina, bicuculina, antagonista de los receptores de GABA<sub>A</sub> e ICS-205,930, antagonista de los receptores de serotonina. Los valores de CI<sub>50</sub> obtenidos para el receptor nativo de las CCI's son similares a los reportados para el nAChR de las CCE's y para los recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  (*Tabla 2*). Por otro lado, en esta parte del trabajo mostramos que dos toxinas peptídicas (PeIA y RgIA), ambas pertenecientes a la familia de las  $\alpha$ -conotoxinas, bloquearon las corrientes activadas por la ACh en las CCI's, así como también las corrientes sinápticas activadas por despolarización de los terminales pre-sinápticos. El bloqueo de las respuestas a la ACh por estas toxinas fue dependiente de la concentración utilizada. Los valores de CI<sub>50</sub> obtenidos para las  $\alpha$ -CTx PeIA y RgIA se muestran en la *Tabla 2*, donde además se comparan con los valores observados para el receptor recombinante heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ .

Como se puede apreciar en la *Tabla 2*, los valores de CI<sub>50</sub> obtenidos para todos estos antagonistas sobre los receptores nativos se correlacionan con sus respectivos valores reportados para los receptores recombinantes  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$ . Además, los valores de

CI<sub>50</sub> observados para la estricnina, bicuculina e ICS-205,930 sobre los receptores nativos y recombinantes son similares a los reportados para sus propios receptores (Vanner y Sruprenant, 1990; Maricq *et al.*, 1991; Turconi *et al.*, 1991; Schmieden *et al.*, 1992; Sigel *et al.*, 1992).

Compuesto	CCIs	CCEs	α9	α9α10
<b>Agonista (CE<sub>50</sub>)</b>				
Acetilcolina	60.7 μM	7-22 μM <sup>2,4,5,6</sup> 122 μM <sup>11</sup>	11.4 μM <sup>7,8</sup>	13.8 μM <sup>10</sup>
<b>Antagonistas (CI<sub>50</sub>)</b>				
Nicotina	1 μM	Rango μM <sup>6</sup>	31.5 μM <sup>7,8</sup>	3.9 μM <sup>10</sup>
Estricnina	8.6 nM	Rango nM <sup>1,2,3,4</sup>	18 nM <sup>7,9</sup>	20 nM <sup>10</sup>
Bicuculina	0.3 μM	Rango μM <sup>2</sup>	0.8 μM <sup>9</sup>	1 μM <sup>10</sup>
ICS-205,930	59 nM	ND	20 nM <sup>9</sup>	20 nM <sup>10</sup>
α-CTx PeIA	4.4 nM	ND	ND	6.9 nM <sup>12</sup>
α-CTx RgIA	6.6 nM	ND	ND	5.2 nM <sup>13</sup>

**Tabla 2: Propiedades farmacológicas del receptor nativo de las CCIs comparada con la del receptor de las CCEs y con la de los receptores recombinantes α9 y α9α10.** Se incluyen los valores disponibles en la literatura de las CE<sub>50</sub> y de las CI<sub>50</sub> para los receptores recombinantes y para el nativo de las CCEs. ND: no disponible. (1) (Dulon y Lenoir, 1996); (2) (Erostegui *et al.*, 1994a); (3) (Fuchs y Murrow, 1992a); (4) (Housley y Ashmore, 1991); (5) (Kakehata *et al.*, 1993); (6) (McNiven *et al.*, 1996); (7) (Elgoyhen *et al.*, 1994); (8) (Verbitsky *et al.*, 2000); (9) (Rothlin *et al.*, 1999); (10) (Elgoyhen *et al.*, 2001); (11) (Blanchet *et al.*, 2000); (12) (McIntosh *et al.*, 2005); (13) (Ellison *et al.*, 2006).

La afinidad aparente del receptor nativo de las CCIs por la ACh es un tanto menor que la reportada para los receptores recombinantes α9 y α9α10 y para el receptor nativo de las CCEs (Tabla 2). Sin embargo, es mayor que la afinidad aparente encontrada por Blanchet y colaboradores (2000) para el nAChR de las CCEs de cobayos (CE<sub>50</sub> = 122 μM). Varios factores podrían explicar estas diferencias en los valores de CE<sub>50</sub>: especies

diferentes, el tipo de preparación usada (oocitos, células ciliadas aisladas, preparación aguda del órgano de Corti), mediciones de corrientes combinadas (*nAChR* + *SK*) versus *nAChR* aisladas (ver Blanchet *et al.*, 2000) y además, una fuente muy importante de variaciones podría ser la composición iónica de las soluciones externas e internas usadas para evaluar este parámetro.

#### *Implicancias Fisiológicas.*

Debido a la alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor nativo de las CCIs y al papel crítico que juega este catión sobre la naturaleza inhibitoria de esta sinapsis colinérgica rápida, no es sorprendente que su actividad esté estrechamente regulada por el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en un rango de concentraciones fisiológicas. En períodos de una intensa actividad sináptica, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la brecha sináptica podría reducirse enormemente (Brown *et al.*, 1995) y así, se ejercería un tipo de control negativo disminuyendo la función del receptor. Durante períodos de actividad sináptica normal, a concentraciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en la perilinfa (1.3 y 0.9 mM, respectivamente), la corriente total, principalmente de iones monovalentes, a través del receptor resultaría reducida debido al efecto de oclusión que los cationes divalentes ejercen sobre la corriente entrante de  $\text{Na}^+$ . De esta manera, la función principal de este receptor no es la de cambiar el voltaje de membrana debido al pasaje de iones monovalentes a través del canal, sino la de aumentar la concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$  que lleva a la subsiguiente activación de los canales SK2 que hiperpolarizan a la célula.

#### *Conclusión.*

Las características biofísicas encontradas para el receptor nativo de las CCIs, como el patrón de desensibilización, la sensibilidad al voltaje y la modulación por el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, sumado al hecho de que ambas subunidades se expresan en estas células (Elgoyhen *et al.*, 2001), nos permiten concluir que el receptor nativo de estas células está compuesto por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ .

## *Parte II*

### *Desarrollo de la funcionalidad de la sinapsis colinérgica nicotínica en las células ciliadas internas de la cóclea de ratas*



## **Introducción**

Un aspecto interesante del desarrollo de la inervación eferente en mamíferos es que las fibras olivococleares mediales hacen contactos axosomáticos con las CCIs inmaduras antes o al mismo tiempo de inervar a las CCEs, principalmente la primer fila de CCEs (Simmons *et al.*, 1996b; Eatock y Hurley, 2003; Simmons, 2002). Esta inervación eferente a las CCIs es transitoria y desaparece al comienzo de la audición, que en ratas y en ratones es alrededor del día 12-13 postnatal. Estos contactos transitorios fueron descritos en varias especies (Lenoir *et al.*, 1980; Ginzberg y Morest, 1984; Emmerling *et al.*, 1990; Sobkowicz y Slapnick, 1994; Simmons *et al.*, 1996b; Simmons *et al.*, 1998). Sin embargo, nunca se había demostrado que esta sinapsis fuera funcional ni que las CCIs fueran sensibles a la ACh, hasta que Glowatzki y Fuchs (2000), utilizando explantos de cóclea de rata, demostraron la presencia de corrientes sinápticas y de corrientes activadas por la aplicación de la ACh a las CCIs previo al comienzo de la audición.

Si bien no está claro aún cual es la función de esta sinapsis transitoria, se postula que estaría involucrada en la maduración y el establecimiento correcto de las vías auditivas durante el desarrollo (Glowatzki y Fuchs, 2000; Eatock y Hurley, 2003; Fuchs, 2006). La inhibición colinérgica a las CCIs podría ser importante tanto para la maduración de las CCIs como para la generación del disparo rítmico de las neuronas aferentes inmaduras (Eatock y Hurley, 2003). Walsh y colaboradores (1998) trabajando con gatos, mostraron que luego de seccionar los terminales eferentes olivococleares, las neuronas aferentes inmaduras cambian el patrón de disparo de rítmico a continuo. Las CCIs inmaduras presentan potenciales de acción espontáneos de  $Ca^{2+}$  que causan la liberación de neurotransmisor en la sinapsis aferente (Kros *et al.*, 1998; Beutner y Moser, 2001), la frecuencia de estos potenciales de acción disminuye ante la aplicación exógena de la ACh (Glowatzki y Fuchs, 2000). De esta manera, se propone que la ACh liberada a partir de los terminales eferentes modularía la liberación del neurotransmisor en la sinapsis aferente y podría de esta manera contribuir a la actividad espontánea y al patrón de disparo rítmico del nervio auditivo inmaduro. Un disparo coordinado de las fibras

aferentes podría influenciar la diferenciación sináptica, como se ha sugerido para las conexiones retinogeniculadas en las vías visuales (Cabelli *et al.*, 1995).

De acuerdo a lo descrito en el apartado I de esta tesis, la sinapsis transitoria entre las fibras eferentes olivococleares y las CCIIs está mediada por un receptor colinérgico nicotínico compuesto por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ . Las CCIIs expresan el ARN mensajero que codifica para la subunidad  $\alpha 9$  desde estadios embrionarios hasta el adulto (Elgoyhen *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1998a; Simmons y Morley, 1998; Morley y Simmons, 2002). Por otro lado, la expresión de la subunidad  $\alpha 10$  desaparece luego del comienzo de la audición, período en el cual también desaparece la inervación eferente medial a las CCIIs (Elgoyhen *et al.*, 2001; Morley y Simmons, 2002).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la ontogenia de las respuestas colinérgicas en las CCIIs desde la llegada de las fibras eferentes olivococleares (P1-P3) hasta el comienzo de la audición (P12-P13) y en días posteriores al mismo (P14-P22), para analizar si existe una correlación directa entre la expresión de la subunidad  $\alpha 10$  y la sensibilidad colinérgica de las CCIIs. Al mismo tiempo, este estudio nos permitirá corroborar lo expuesto en el apartado I de esta tesis: el receptor nativo de las CCIIs, al igual que el receptor recombinante expresado en oocitos de *Xenopus laevis*, requiere de la subunidad  $\alpha 10$  para su función óptima.

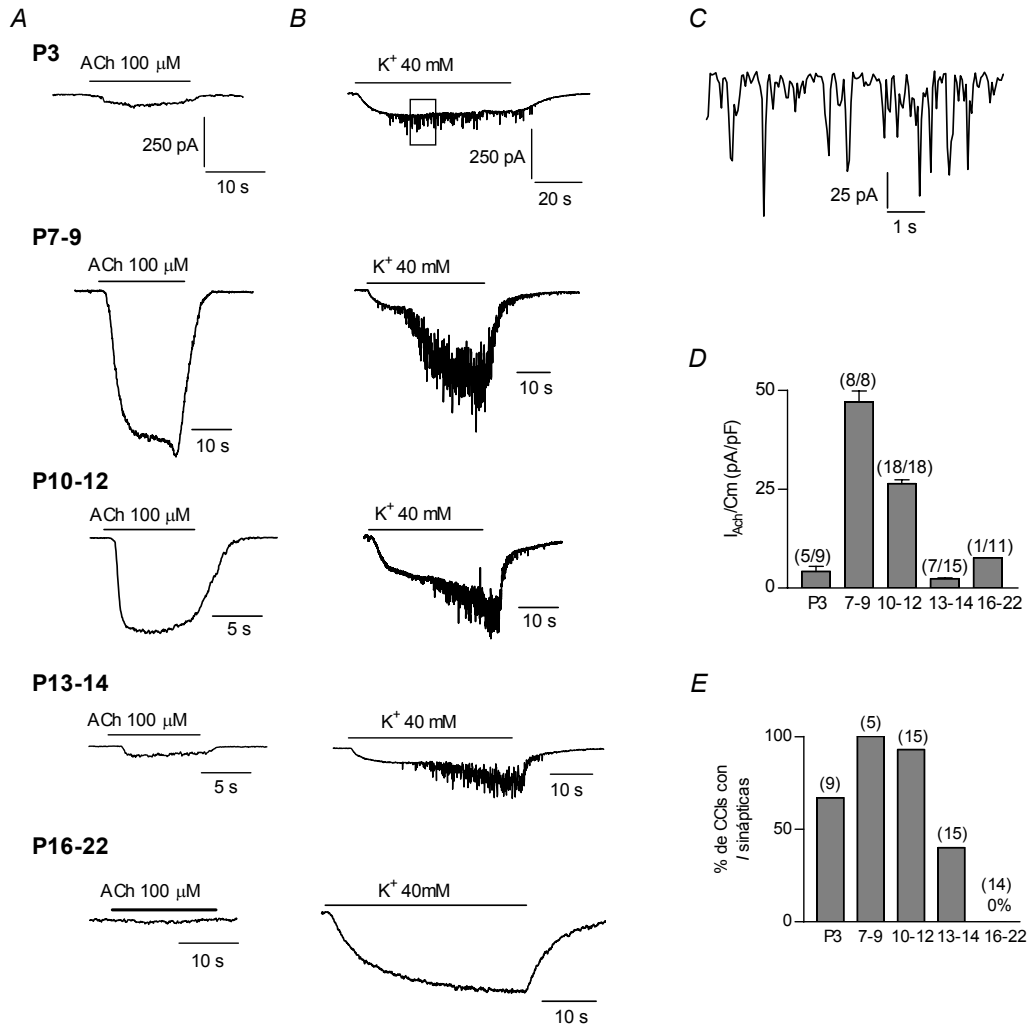
## Resultados

### *Estudio de las respuestas colinérgicas en las CCI's durante el desarrollo.*

Con el propósito de evaluar los cambios en la sensibilidad a la ACh durante el desarrollo, se analizaron las CCI's de ratas de las siguientes edades postnatales: P3, P7-P9, P10-P12, P13-P14 y P16-P22. En las células ciliadas de la cóclea, las corrientes activadas por la aplicación de la ACh están mediadas por un flujo combinado de cationes a través del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  y un flujo de  $K^+$  a través de canales de  $K^+$  sensibles al  $Ca^{2+}$  del tipo SK2 (ver Parte I de esta tesis y Fuchs y Murrow, 1992b; Blanchet *et al.*, 1996; Evans, 1996; Dulon *et al.*, 1998; Glowatzki y Fuchs, 2000; Oliver *et al.*, 2000). Así, a potenciales de membrana negativos al  $E_K$  (-82 mV), como por ejemplo a -90 mV, la corriente entrante activada por la aplicación de la ACh está mediada por un flujo de corriente tanto por el nAChR como por el canal SK2 (ver *Figura 9* de la Parte I).

La aplicación en el baño de ACh 100  $\mu$ M provocó respuestas entrantes en las CCI's desde P3 hasta P14 cuando fueron sostenidas a un potencial de membrana de -90 mV. En P16-P22, sin embargo, sólo se observó una corriente activada por la ACh en 1 de 11 células estudiadas. Como se muestra en el gráfico de barras de la *Figura 21D* y en los registros representativos en *A*, las amplitudes de las respuestas ante la aplicación de ACh (que fueron normalizadas a la capacitancia de la célula con el fin de tener en cuenta cualquier cambio en el tamaño de la misma durante el desarrollo), fueron pequeñas en P3 ( $4.2 \pm 1.2$  pA/pF; n=5 células), alcanzaron un máximo en P7-P9 ( $47 \pm 7.7$  pA/pF; n=8 células), comenzaron a disminuir nuevamente en P10-P12 ( $26.3 \pm 4.2$  pA/pF; n=18 células) y se redujeron considerablemente en P13-P14 ( $2.3 \pm 0.4$  pA/pF; n=7 células). La amplitud de la corriente obtenida en la única CCI que respondió a la aplicación de la ACh del grupo de P16-P22 fue de 7.6 pA/pF.

Para estudiar si una dada célula tiene tanto nAChRs funcionales como sinapsis colinérgicas activas, se elevó la concentración de  $K^+$  extracelular de 5.8 a 40 mM para despolarizar los terminales eferentes y consecuentemente, provocar la liberación del neurotransmisor. Al aumentar la concentración de  $K^+$  en el baño, se observó una corriente entrante en las CCI's sostenidas a un potencial de membrana de -90 mV (*Figura 21B*). Esta corriente se debe probablemente a conductancias de  $K^+$  en el reposo ya que el  $E_K$



**Figura 21: Corrientes activadas por ACh y corrientes sinápticas activadas por alto  $K^+$  durante el desarrollo.** *A*, registros representativos de las corrientes combinadas ( $nAChR+SK$ ) provocadas por la aplicación de ACh 100  $\mu M$  en CCIs de diferentes edades postnatales. *B*, registros representativos de las corrientes sinápticas provocadas por la aplicación de una solución extracelular conteniendo KCl 40 mM. En P16-P22, se produjo un cambio en la corriente de sostén ante la aplicación de  $K^+$  40 mM pero no se observaron corrientes sinápticas. Los registros que se muestran en *A* y en *B* a cada edad fueron de la misma CCI. *C*, corrientes sinápticas correspondientes al recuadro del registro superior que se muestra en *B*, graficadas en una escala de tiempo más lenta. *D*, gráfico de barras que ilustra la amplitud media  $\pm$  S.E.M de las corrientes activadas por ACh 100  $\mu M$ , normalizadas a la capacitancia de membrana ( $C_m$ ) promedio de cada grupo. Los números entre paréntesis corresponden al número de células con respuesta a ACh 100  $\mu M$  por número de células totales examinadas. En el cálculo de la amplitud media se incluyen sólo las células positivas a la ACh. Las amplitudes en P3 y en P13-P14 fueron significativamente diferentes a aquellas obtenidas en P7-P9 ( $p < 0.0019$ ). Los valores de  $C_m$  usados para normalizar las amplitudes fueron (en picofaradios, media  $\pm$  S.E.M): P3,  $10.4 \pm 0.7$ ; P7-P9,  $9.5 \pm 0.4$ ; P10-P12,  $10.0 \pm 0.4$ ; P13-P14,  $12.6 \pm 0.6$ ; P16-P22,  $13.0 \pm 1.0$ . *E*, diagrama de barras que representa el número de CCIs que tenían corrientes sinápticas luego de bañar a las células con una solución salina conteniendo  $K^+$  40 mM. Los números entre paréntesis corresponden al número de células estudiadas en cada edad. En todos los casos la solución intracelular contenía KCl-EGTA. Todos los experimentos se llevaron a cabo en CCIs sostenidas a un potencial de membrana de  $-90$  mV.

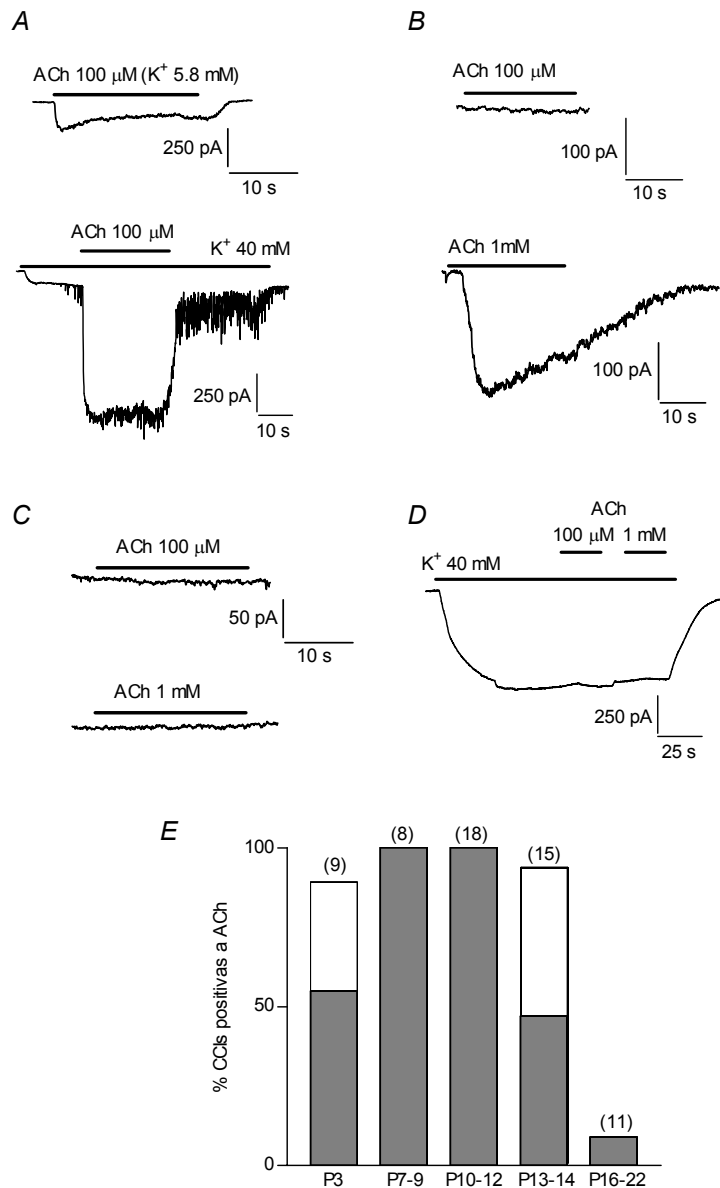
cambió de -82 a -33 mV. Además, se observaron corrientes sinápticas debidas a la liberación de la ACh de los terminales eferentes despolarizados por este tratamiento (*Figura 21B*, el recuadro en el registro superior se muestra en *C* en una escala de tiempo más expandida). Como se muestra en la *Figura 21B* y *E*, el porcentaje de células en las cuales se observó actividad sináptica luego de despolarizar los terminales con  $K^+$  40 mM, también varió con la edad. En P7-P9 y en P10-P12, casi todas (100 y 93%, respectivamente) las CCI's presentaron corrientes sinápticas. En P3 sólo el 67% de las CCI's tenía corrientes sinápticas, mientras que en P13-P14 el porcentaje de células con respuesta fue aún menor (40%). Finalmente, no se encontraron corrientes sinápticas en P16-P22.

En la preparación de cóclea que utilizamos, una concentración de ACh de 100  $\mu$ M no es saturante (la  $CE_{50}$  para la ACh del receptor nativo es de 60.7  $\mu$ M, ver resultados Parte I). Con el objetivo de aumentar la posibilidad de encontrar CCI's con nAChRs funcionales, se amplificaron las respuestas activadas por la ACh cambiando la fuerza impulsora para el  $K^+$  y/o incrementando la concentración de ACh de 100  $\mu$ M a 1 mM. Al cambiar la fuerza impulsora para el  $K^+$ , aumentando la concentración de  $K^+$  extracelular de 5.8 a 40 mM a -90 mV, se observó un incremento de  $2.9 \pm 1.6$  (n=9 células) veces en las amplitudes de las corrientes activadas por la ACh (*Figura 22A*). Estos datos fueron promediados de experimentos realizados en CCI's desde P3 hasta P13-P14. La *Figura 22B* muestra un registro representativo de una CCI en P3 que no respondió a la aplicación de ACh 100  $\mu$ M, pero sí cuando se aumentó la concentración del agonista a 1 mM. Ambos tratamientos fueron efectivos para amplificar las respuestas en CCI's desde P3 hasta P13-P14. Sin embargo, en P16-P22, ni el incremento en la concentración de ACh a 1 mM (*Figura 22C*), ni el cambio en la fuerza impulsora para el  $K^+$  o ambos tratamientos aplicados al mismo tiempo (*Figura 22D*), lograron convertir a una célula que no responde en una sensible a la ACh. En el diagrama de barras de la *Figura 22E* se observa que desde P7 hasta P12, el 100% de las células examinadas respondieron a ACh 100  $\mu$ M. En P3 y en P13-P14, sólo el 55 y el 47% de las células respondieron a ACh 100  $\mu$ M. Sin embargo, cuando se aumentó la concentración de ACh a 1 mM, se produjo un incremento en el porcentaje de células sensibles. En P3 del 55 al 89% (n=4 células) y en P13-P14 del 47 al 93% (n=7 células). En contraste, en P16-P22, la ACh a una concentración de 1 mM no

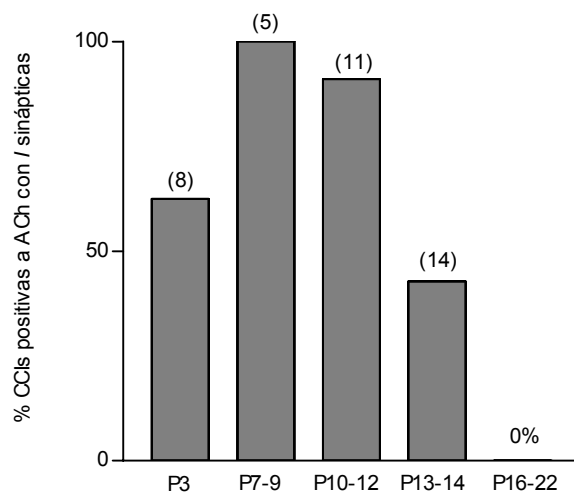
provocó respuestas en las CCIs que fueron negativas a ACh 100  $\mu$ M (n=4 células). Estos resultados sugieren que a partir de P16, las CCIs carecen de nAChRs funcionales. Estudios previos mostraron que luego del comienzo de la audición, la mayoría de los contactos eferentes a las CCIs desaparecen (Lieberman *et al.*, 1990; Simmons, 2002). Por lo tanto, la pérdida de nAChRs funcionales podría resultar del retraimiento de las fibras eferentes de las CCIs. Para analizar esta posibilidad, comparamos el curso temporal de la desaparición de las respuestas activadas por la ACh con la de las corrientes sinápticas activadas con alto  $K^+$ . El gráfico de barras de la *Figura 23* muestra una correlación entre la expresión de nAChRs funcionales y la actividad sináptica. En P3, aproximadamente el 50% de las células que respondieron a la ACh tenían corrientes sinápticas, lo que indica que a esta edad no todas las células que tienen receptores funcionales están inervadas por fibras eferentes. Desde P7 hasta P12, casi todas las células presentaban tanto corrientes activadas por la ACh exógena como por la ACh liberada desde la sinapsis. Sin embargo, en P13, sólo el 40% de las células positivas a la ACh tenían corrientes sinápticas, sugiriendo que la sinapsis eferente deja de operar antes de que todos los nAChRs funcionales desaparezcan de las CCIs.

#### *Acople del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ con el canal SK2.*

El hecho de que la sinapsis entre las fibras eferentes olivococleares y las células ciliadas sea inhibitoria, se debe a la activación del canal SK2 luego de la entrada del  $Ca^{2+}$  a la célula a través del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  (Fuchs y Murrow, 1992a; Blanchet *et al.*, 1996; Evans, 1996; Dulon *et al.*, 1998; Glowatzki y Fuchs, 2000; Oliver *et al.*, 2000). Para analizar si las respuestas colinérgicas están acopladas a la activación del canal SK2 durante el desarrollo, medimos las corrientes combinadas (*nAChR + SK*) activadas por la ACh a distintos voltajes. En la apartado I de esta tesis mostramos que cuando usamos una solución intracelular conteniendo KCl-EGTA y una solución externa con una concentración de  $K^+$  de 5.8 mM, el  $E_{rev}$  de las corrientes combinadas (*nAChR + SK*) fue de  $-67.6$  mV en CCIs en P9-P11 (*Figura 9*). Entonces, si se activa el canal SK2, una corriente saliente de  $K^+$  se debería evidenciar a potenciales de membrana positivos al  $E_{rev}$ . Como se muestra en la *Figura 24A*, las corrientes activadas por la aplicación de la ACh



**Figura 22: Variación en el porcentaje de células sensibles a la ACh durante el desarrollo.** *A*, registros representativos de las corrientes activadas por ACh 100  $\mu$ M en  $K^+$  5.8 (arriba) y 40 mM (abajo) en una CCI en P10. El aumento de la fuerza impulsora en alto  $K^+$ , resultó en un incremento de las amplitudes de las respuestas a la ACh. *B*, registros representativos que muestran que la ACh 1 mM ( $K^+$  5.8 mM) provocó respuestas en las CCIs que no respondieron a la ACh 100  $\mu$ M en P3. Los registros en *C* y en *D* muestran que ninguno de los tratamientos utilizados para amplificar las respuestas a la ACh fueron efectivos en CCIs en P16-P22. A esta edad, sólo respondió una CCI de las 11 estudiadas y ninguna de ellas presentó corrientes sinápticas. *E*, diagrama de barras que representa el porcentaje de células que respondieron a la ACh ( $K^+$  5.8 mM). En P7-P9 y en P10-P12, la ACh 100  $\mu$ M produjo corrientes en todas las células estudiadas. En P3 y en P13-P14, el porcentaje de células que respondieron a la ACh se incrementó al aumentar la concentración de ACh a 1 mM (parte blanca del gráfico de barras). En contraste, en P16-P22, el incremento en la concentración de ACh a 1 mM no tuvo efecto en las células que no respondieron. Los números entre paréntesis corresponden al número de células estudiadas en cada grupo. En todos los casos la solución intracelular contenía KCl-EGTA. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en CCIs sostenidas a un potencial de membrana de  $-90$  mV.



**Figura 23: Variación en la fracción de células sensibles a la ACh que presentaron corrientes sinápticas.** Gráfico de barras que ilustra el porcentaje de células sensibles a la ACh que también presentaron corrientes sinápticas activadas por alto  $K^+$  a las distintas edades postnatales. Los números entre paréntesis son el número de células positivas a ACh que fueron bañadas con  $K^+$  40 mM para evaluar la actividad sináptica. En P16, la única célula que tuvo respuesta a la ACh exógena no presentó corrientes sinápticas.

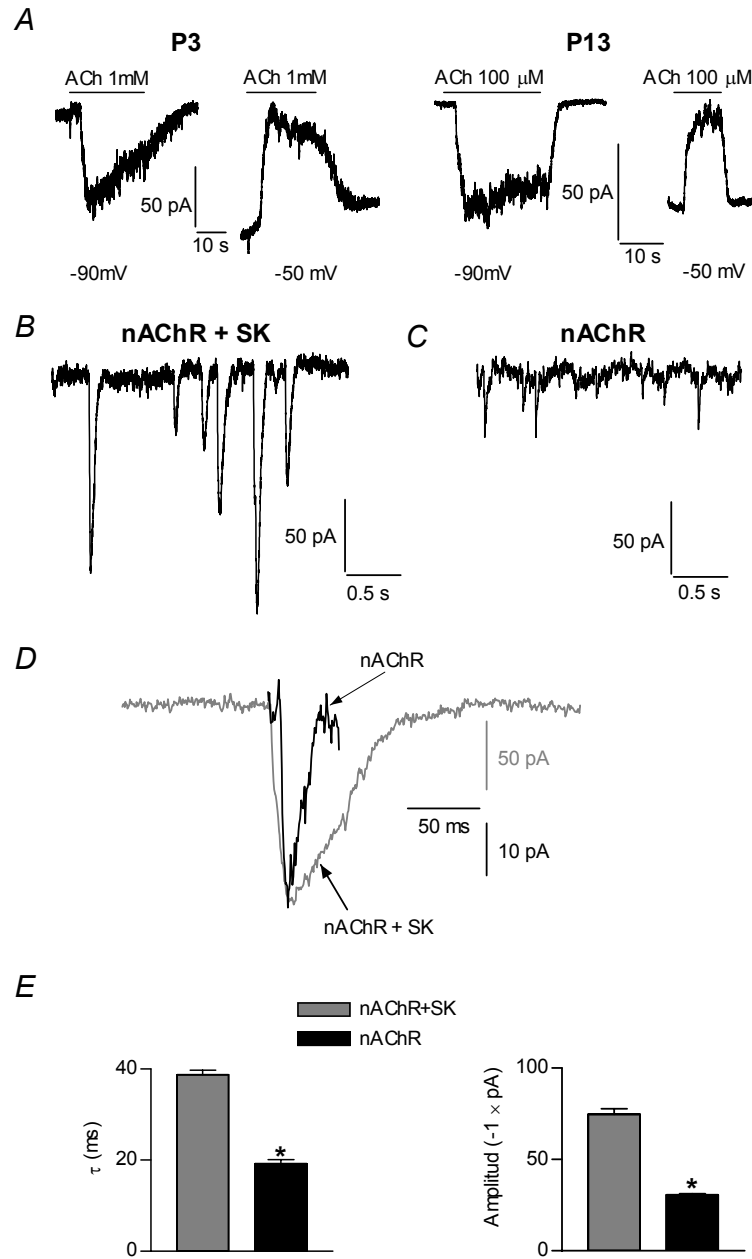
fueron entrantes a un potencial de membrana de  $-90$  mV y salientes a  $-50$  mV a todas las edades estudiadas (P3, P9, P13;  $n=3-6$  células; se ilustran sólo los registros en P3 y P13). Estos resultados indican que las respuestas colinérgicas están acopladas a la activación del canal SK2 en las dos primeras semanas postnatales.

Otra forma de estudiar el acople del nAChR con el canal SK2 durante el desarrollo es evaluando los parámetros cinéticos de las corrientes sinápticas. En el apartado I mostramos que la cinética de las corrientes sinápticas espontáneas aisladas de los canales SK2, a  $-90$  mV, fue más rápida que la de las corrientes combinadas. (*Figura 16*). Por lo tanto, examinamos la amplitud y la cinética de las corrientes sinápticas activadas por alto  $K^+$  en CClis en P9-P11 en dos condiciones experimentales: con y sin el canal SK2 acoplado. En el primer caso utilizamos una solución de pipeta conteniendo KCl-EGTA, mientras que en el segundo, para bloquear las corrientes a través del canal SK2, usamos BAPTA en la solución intracelular. En la *Figura 24B* se muestra un registro representativo de las corrientes sinápticas activadas por alto  $K^+$ , utilizando una solución intracelular conteniendo KCl-EGTA. En esta condición, las corrientes sinápticas en las

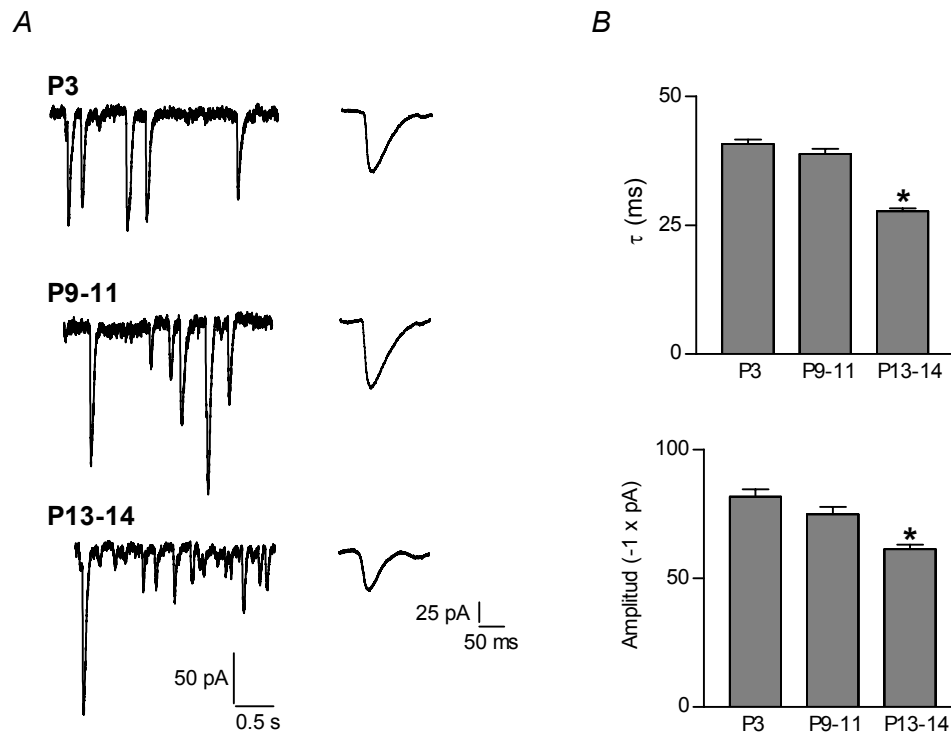


CCIs, sostenidas a un potencial de membrana de  $-90$  mV, están compuestas de corrientes entrantes a través del nAChR y del canal SK2. Por otro lado, las corrientes sinápticas registradas con una pipeta conteniendo BAPTA, deberían estar compuestas únicamente por corrientes a través del nAChR (*Figura 24C*). Como se puede observar en la *Figura 24B-E*, tanto la amplitud como la cinética de las corrientes sinápticas combinadas, fueron significativamente mayores y más lentas que aquellas mediadas por el nAChR solo. Los valores de amplitudes y tiempos de decaimiento de las corrientes fueron de: *nAChR + SK*: amplitud =  $-74.8 \pm 2.9$  pA,  $\tau_{\text{decaimiento}} = 40.7 \pm 0.9$  ms, correspondiente a 213 eventos sinápticos en 10 células; *nAChR*: amplitud =  $-34.9 \pm 1.2$  pA,  $\tau_{\text{decaimiento}} = 23.1 \pm 1.0$  ms, 256 eventos, 4 células;  $p < 0.0001$ .

Luego, analizamos el curso temporal de las corrientes sinápticas combinadas (*nAChR + SK*) activadas por alto  $K^+$  en las diferentes edades postnatales, esto es, antes, durante y después del comienzo de la audición (*Figura 25A y B*). Desde P3 hasta P11 no se encontraron diferencias significativas en los parámetros cinéticos de las corrientes sinápticas combinadas (P3, amplitud =  $-81.6 \pm 2.9$  pA,  $\tau_{\text{decaimiento}} = 40.7 \pm 0.9$  ms, 225 eventos, 5 células; P9-P11,  $-74.8 \pm 2.9$  pA,  $\tau_{\text{decaimiento}} = 40.7 \pm 0.9$  ms, 213 eventos, 10 células). Sin embargo, en P13-P14, se observó una disminución (de aproximadamente un 25 %) en la amplitud y las constantes de tiempo de decaimiento de las corrientes sinápticas, comparadas con las de las edades más tempranas ( $-61.3 \pm 1.7$  pA,  $\tau_{\text{decaimiento}} = 27.7 \pm 0.6$  ms, 365 eventos, 6 células; comparados con los valores en P3 y en P9-P11;  $p < 0.001$ ). Este cambio en los parámetros cinéticos de las corrientes sinápticas indicaría una menor contribución del canal SK2 a la corriente combinada ya que este canal posee una cinética de activación más lenta.



**Figura 24: Acople entre las corrientes colinérgicas y la activación del canal SK2.** *A*, registros representativos de las corrientes provocadas por la aplicación de la ACh en CCI en P3 y en P13, sostenidas a los voltajes que se indican bajo cada registro. En todos los casos la solución intracelular contenía KCl-EGTA. ( $n=3-6$  células). *B*, registro representativo de las corrientes sinápticas combinadas (*nAChR* + *SK*) activadas por  $K^+$  40 mM en una CCI en P9-P11 ( $E_K$ , -35 mV). La solución intracelular contenía KCl-EGTA. *C*, registro representativo de las corrientes sinápticas aisladas (*nAChR*) activadas por alto  $K^+$  en una CCI en P9-P11 ( $E_K$ , -35 mV). En este caso la solución intracelular contenía KCl-BAPTA. *D*, registros representativos de una corriente sináptica combinada (trazo gris) y una colinérgica aislada (en negro) normalizados y superpuestos con el fin de ilustrar la cinética más lenta de las corrientes colinérgicas acopladas al SK2. *E*, gráficos de barras que muestran que las corrientes sinápticas combinadas tenían una cinética más lenta y mayor amplitud que las colinérgicas aisladas ( $p < 0.0001$ ). Las amplitudes se representan en valores absolutos. *nAChR*, 256 eventos, 4 células; *nAChR* + *SK*, 213 eventos, 10 células. Los registros que se muestran en *B-D* fueron realizados a un potencial de membrana de -90 mV.



**Figura 25: Análisis de las amplitudes y los parámetros cinéticos de las corrientes sinápticas durante el desarrollo.** *A*, registros representativos de las corrientes sinápticas combinadas (*nAChR* + *SK*) activadas por la aplicación de  $K^+$  40 mM en las distintas edades postnatales. A la derecha de cada registro se muestran los trazos promediados de 30 a 40 eventos sinápticos individuales. *B*, diagramas de barras que ilustran los tiempos de decaimiento y las amplitudes de las corrientes sinápticas durante el desarrollo. Ambos parámetros permanecieron constantes desde P3 hasta P11 y en P13-P14 disminuyeron aproximadamente un 25 % ( $p < 0.001$ ). P3, 225 eventos sinápticos, 5 células; P9-P11, 213 eventos, 10 células; P13-P14, 365 eventos, 6 células. Las amplitudes se representan en valores absolutos. En todos los casos la solución intracelular contenía KCl-EGTA.

## Discusión

### *Variación de las respuestas colinérgicas en las CCIIs durante el desarrollo.*

Los registros electrofisiológicos en las CCIIs de ratas desde P3 hasta P22, mostraron que la sinapsis entre las fibras eferentes olivococleares y las CCIIs es funcional por lo menos desde P3 y continúa transmitiendo hasta P13-P14. Luego de P14, las CCIIs no respondieron a la ACh liberada de los terminales pre-sinápticos ni a la aplicada de manera exógena, lo que sugiere la pérdida de nAChR funcionales. Desde P3 hasta P13-P14, se observaron cambios significativos en la amplitud de las respuestas ante la aplicación de ACh y en el porcentaje de CCIIs con contactos sinápticos funcionales, lo que estaría indicando que durante este período ocurre una remodelación sináptica. Tanto el porcentaje de células que respondieron a la ACh como la amplitud de sus respuestas fueron significativamente menores en P3 y en P13-P14 que a edades intermedias como en P7-P9 y en P10-P12. Los estudios de microscopía óptica y electrónica sugieren que las fibras eferentes provenientes del sistema olivococlear medial atraviesan un “período de espera” en la región basal de las CCIIs antes de inervar finalmente a las CCEs (Lenoir *et al.*, 1980; Liberman, 1980; Ginzberg y Morest, 1984; Gil-Loyzaga y Pujol, 1988; Emmerling *et al.*, 1990; Knipper *et al.*, 1995; Simmons *et al.*, 1996a, b). El curso temporal de la actividad colinérgica en las CCIIs que describimos en este trabajo, coincide con la maduración de la morfología coclear: inmadura al momento del nacimiento y de tipo adulta en aproximadamente P16 (Pujol *et al.*, 1998). Este curso temporal también se correlaciona con los cambios durante el desarrollo en la inervación eferente a las CCIIs en ratas (Lenoir *et al.*, 1980; Gil-Loyzaga y Pujol, 1988; Knipper *et al.*, 1995), gatos (Ginzberg y Morest, 1984; Liberman *et al.*, 1990), hamsters (Simmons *et al.*, 1996a) y ratones (Emmerling *et al.*, 1990).

### *La actividad del nAChR de las CCIIs se correlaciona con la expresión de la subunidad $\alpha 10$ durante el desarrollo.*

Estudios anteriores mostraron que la subunidad nicotínica  $\alpha 9$  se expresa tanto en las CCIIs como en las CCEs de la cóclea de mamíferos desde estadios embrionarios hasta adultos (Elgoyhen *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1998a; Morley *et al.*, 1998;

Elgoyhen *et al.*, 2001; Morley y Simmons, 2002). En contraste, aunque la subunidad  $\alpha 10$  se expresa en las CCEs desde el embrión hasta el adulto, en las CCIIs la expresión de esta subunidad desaparece luego del comienzo de la audición (Elgoyhen *et al.*, 2001; Morley y Simmons, 2002; Katz *et al.*, 2004). En las CCEs de la vuelta basal de la cóclea de ratas, la cantidad de ARN mensajero que codifica para la subunidad  $\alpha 10$  alcanza un pico máximo en aproximadamente P10 y permanece alta en el estadio adulto (Elgoyhen *et al.*, 2001; Morley y Simmons, 2002). Sin embargo, en las CCIIs, el nivel de expresión del ARN mensajero de  $\alpha 10$  alcanza el pico máximo en P1 y, para P15, la señal vuelve a los niveles basales (Elgoyhen *et al.*, 2001; Morley y Simmons, 2002). Los experimentos de inmunohistoquímica, en los que se utilizó un anticuerpo contra la subunidad nicotínica  $\alpha 10$ , mostraron que en P10, antes del comienzo de la audición, la proteína  $\alpha 10$  se expresa en las CCIIs, mientras que en P15, esta subunidad deja de expresarse en éstas células (Katz *et al.*, 2004). Estos resultados revelan que la pérdida de expresión de la subunidad  $\alpha 10$  se correlaciona con la falta de respuesta electrofisiológica tanto ante la aplicación de la ACh como ante la inducción por alto  $K^+$  de la liberación de neurotransmisor a partir de los terminales eferentes.

Mediante la generación de un ratón mutante nulo (*knock-out*) para el gen *Acra9* se demostró que la subunidad  $\alpha 9$  es un componente fundamental en la estructura del receptor colinérgico de las células ciliadas (Vetter *et al.*, 1999). Estos ratones *knock-out* para el gen *Acra9* carecen de supresión de las respuestas cocleares (potencial de acción compuesto, emisiones otoacústicas) durante la activación de las fibras eferentes, indicando que están funcionalmente de-eferentados. En el presente trabajo demostramos que la subunidad  $\alpha 10$  es también un componente fundamental de este receptor, ya que la falta de respuestas de las CCIIs a la ACh se correlaciona con la disminución en la expresión del gen que codifica para la subunidad  $\alpha 10$  (Katz *et al.*, 2004). El hecho de que la funcionalidad colinérgica de las CCIIs se correlacione con la expresión del ARN mensajero de  $\alpha 10$  y no con la de  $\alpha 9$  fue inesperado. La inyección del ARN mensajero que codifica para la subunidad  $\alpha 9$  en oocitos de *Xenopus laevis* resulta en la formación de nAChRs homoméricos que son funcionales, pero con mucha menor corriente máxima que la expresión de genes relacionados, como  $\alpha 7$  (Bertrand *et al.*, 1992; Séguéla *et al.*, 1993;

Elgoyhen *et al.*, 1994) y con una corriente máxima 100 veces menor comparada con la del nAChR heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ . En este trabajo, no pudimos detectar ninguna corriente en respuesta a la ACh exógena en las CCIIs maduras que expresan el ARN mensajero de  $\alpha 9$ . Esta falta de respuesta podría atribuirse a que la proteína  $\alpha 9$  no está siendo sintetizada o incorporada en la membrana de la célula ciliada. Otra explicación podría ser que las corrientes a través de los canales homoméricos  $\alpha 9$  sea tan pequeña que no podemos discriminarlas del ruido en los registros de *whole-cell*. Por último, otra posibilidad es que la subunidad  $\alpha 9$  adquiriera una función alternativa, no puramente ionotrópica, en las CCIIs maduras.

*Acople entre la respuesta colinérgica y la activación del canal SK2.*

Debido a que la respuesta colinérgica de las células ciliadas involucra tanto la apertura de los nAChRs como la activación de los canales SK2, es posible que durante el desarrollo ocurran cambios en el acople entre estos dos canales. En este trabajo demostramos, mediante la evaluación de los potenciales de reversión de las corrientes combinadas (*nAChR + SK*), que las respuestas provocadas por la aplicación de ACh en las CCIIs entre P3 y P14, involucran siempre la activación de los nAChRs y los canales SK2. No obstante, no podemos descartar la posibilidad de que las respuestas colinérgicas en estadios más tempranos que P3 no estén acopladas a la activación del canal SK2. Durante el desarrollo de la cóclea de mamíferos, el acople funcional entre el nAChR y el SK2 varía entre distintas especies. Por ejemplo, las respuestas colinérgicas de las CCEs de gerbo están acopladas a la activación de canales de  $K^+$  sensibles al  $Ca^{2+}$  a partir de P6, que es la primer edad donde se detectan corrientes activadas por la ACh (He y Dallos, 1999). En contraste, durante la maduración de las CCEs de ratas, la respuesta colinérgica más temprana resulta sólo de la activación del nAChR. El acople con el canal SK2 aparece recién en la segunda semana postnatal (Dulon y Lenoir, 1996).

La cinética, el potencial de reversión y la farmacología de las corrientes sinápticas espontáneas y activadas por alto  $K^+$  en las CCIIs (Glowatzki y Fuchs, 2000 y Parte I de esta tesis), así como también en las CCEs (Oliver *et al.*, 2000), son consistentes con la activación del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  y del canal SK2. El curso temporal del decaimiento de las corrientes post-sinápticas inhibitorias está determinado por la velocidad de cierre del

canal SK2 (Oliver *et al.*, 2000). De esta manera, un estudio detallado de la cinética de estas corrientes podría darnos más información acerca de los cambios que ocurren durante el desarrollo con los componentes individuales o con su acople. Las amplitudes y las constantes de tiempo de decaimiento de las corrientes sinápticas activadas por alto  $K^+$  fueron idénticas hasta P11. Sin embargo, en P13-P14, estas corrientes fueron más rápidas y de menor amplitud. A pesar de que las respuestas ante la aplicación de la ACh exógena muestran una contribución del canal SK2 en todas las edades estudiadas, la evaluación de las corrientes sinápticas indica que la reducción en la sensibilidad colinérgica en la segunda semana postnatal, podría deberse a una disminución en el acople entre el nAChR y el canal SK2. Este cambio en los parámetros cinéticos de las corrientes sinápticas podría ser el resultado de una menor contribución del canal SK2 a la corriente combinada (*nAChR + SK*), ya que el canal SK2 posee una cinética de activación más lenta y por lo tanto es el limitante de la velocidad (Oliver *et al.*, 2000). Los estudios de inmunohistoquímica mostraron que la proteína SK2 se expresa en las CCI durante las dos primeras semanas postnatales, pero su expresión se reduce luego del comienzo de la audición (Katz *et al.*, 2004). Por lo tanto, una menor contribución del canal SK2 a la corriente combinada podría deberse a la reducción en la expresión de este canal y/o a que la señalización por el  $Ca^{2+}$  es menos efectiva.

#### *Expresión de nAChR $\alpha 9\alpha 10$ funcionales y actividad sináptica eferente.*

Como discutimos anteriormente, nuestros resultados muestran que a partir de P16 las CCI carecen de nAChRs funcionales y esto se correlaciona con la disminución en la expresión de la subunidad  $\alpha 10$  (Katz *et al.*, 2004). Además, estudios de microscopía óptica y electrónica, mostraron que luego de P16, las CCI tienen muy pocos o ningún contacto axosomático eferente (Lieberman *et al.*, 1990; Simmons, 2002). En el presente trabajo mostramos que en P3 no todas las células que tienen receptores funcionales están funcionalmente inervadas por las fibras eferentes. Esto significa que los nAChRs que contienen a la subunidad  $\alpha 10$ , están presentes en la membrana de la célula antes de que se forme la sinapsis eferente. Un patrón similar de desarrollo de los contactos sinápticos se ha observado en el músculo esquelético (Schuetze y Role, 1987; Role y Berg, 1996). Estos resultados indican que los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ , podrían estar también involucrados en

otras funciones durante el desarrollo de la cóclea, como la regulación de la expresión génica y la formación y estabilización de las sinapsis, como se ha postulado para otros nAChRs (Schuetze y Role, 1987; Role y Berg, 1996).

El hecho de que siga habiendo nAChRs funcionales luego del cese de la actividad sináptica, sugiere que el mantenimiento de la sinapsis eferente no estaría regulado por la expresión del receptor. Más aún, sugiere que el mantenimiento de receptores funcionales depende de la actividad sináptica. Se sabe que la actividad eléctrica durante el desarrollo y la desnervación, tanto en el músculo como en neuronas, puede regular el patrón de expresión de subunidades nicotínicas (Hall y Sanes, 1993; Corriveau *et al.*, 1995; Zoli *et al.*, 1995). En ausencia de inervación en el ganglio ciliar de pollo en desarrollo, los niveles de expresión de las subunidades nicotínicas  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 4$  se reducen (Levey *et al.*, 1995). Este parece ser el caso para la subunidad  $\alpha 10$ , ya que su expresión en las CCI se reduce luego de que se retiran los contactos sinápticos eferentes (Katz *et al.*, 2004).

La inervación eferente a las CCI se pierde muy pronto luego del comienzo de la audición en P12. Estos cambios en la actividad sináptica eferente se correlacionan con varios cambios significativos en las CCI. Al comienzo de la audición, las mismas comienzan a transmitir continuamente hacia el sistema nervioso central y esto se caracteriza por modificaciones en la expresión de varios canales iónicos. En particular, disminuye la expresión de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{Na}^+$  dependientes del voltaje (Beutner y Moser, 2001; Marcotti *et al.*, 2003a), y aparece una corriente de  $\text{K}^+$  de activación rápida y de gran amplitud que fluye a través de canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  de alta conductancia (canales de tipo BK) (Kros *et al.*, 1998; Marcotti *et al.*, 2003b). Como resultado de esto, las CCI no generan más potenciales de acción de  $\text{Ca}^{2+}$  y se vuelven más lineales en sus respuestas ante la activación por el sonido. Estos cambios pronunciados en la excitabilidad de la célula podrían estar regulando la función sináptica de la misma. En este sentido, se ha demostrado que en un ratón *knock-out* para el canal de calcio Cav1.3, las CCI inmaduras no son capaces de generar potenciales de acción, se altera la expresión de los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  de alta conductancia y se retrasa la desaparición de las sinapsis colinérgicas olivococleares transitorias a estas células hasta aproximadamente la cuarta semana postnatal (Brandt *et al.*, 2003).



Los cambios que ocurren durante el desarrollo en los componentes principales de la sinapsis eferente, esto es, la expresión de receptores colinérgicos funcionales, canales SK2 acoplados a la activación de estos nAChRs y la presencia de contactos sinápticos axosomáticos, coinciden con los cambios ultraestructurales de la célula, como por ejemplo la presencia de cisternas sinápticas. Estas especializaciones post-sinápticas en las CCIs, aunque son mucho menos regulares que las que se encuentran en las CCEs, están presentes en estadios postnatales tempranos y desaparecen luego del comienzo de la audición (Ginzberg y Morest, 1984).

### *Conclusión.*

La correlación entre la expresión de la subunidad nicotínica  $\alpha 10$ , el canal SK2 y la presencia de sinapsis funcionales en las CCIs, sugiere que estos genes estarían regulados por actividad sináptica. Demostramos, además, que la subunidad nicotínica  $\alpha 10$ , como se demostró previamente para  $\alpha 9$  (Vetter *et al.*, 1999), es también un componente fundamental del receptor coclear nativo.

### *Parte III*

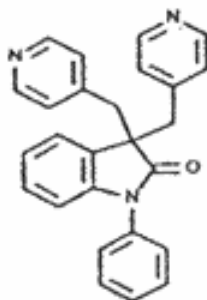
*Efecto de la linopiridina sobre el nAChR coclear nativo y  
el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  recombinante*

## Introducción

Como hemos mencionado anteriormente, el receptor colinérgico de las células ciliadas presenta un perfil farmacológico muy peculiar y diferente al descrito para los nAChRs musculares y neuronales (Housley y Ashmore, 1991; Fuchs y Murrow, 1992a; Kakehata *et al.*, 1993; Erostequi *et al.*, 1994a; Blanchet *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1996; Dulon y Lenoir, 1996; Evans, 1996; McNiven *et al.*, 1996), lo que sugirió la presencia de un nuevo subtipo de receptor en estas células (Fuchs, 1996). Las subunidades nicotínicas  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  son miembros distantes de la familia de los nAChRs y, cuando se expresan en oocitos de *Xenopus laevis*, son capaces de formar un receptor heteromérico que posee un perfil farmacológico muy diferente al de otros receptores colinérgicos. Estudiando la farmacología de este receptor se han encontrado diversas drogas que actúan como antagonistas del mismo, entre las que se cuentan no sólo moduladores nicotínicos y muscarínicos sino también glicinérgicos, gabaérgicos y serotoninérgicos (Elgoyhen *et al.*, 1994; Elgoyhen *et al.*, 2001). Las propiedades biofísicas y farmacológicas del receptor recombinante heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  son muy similares a las descritas para el receptor que media la sinapsis entre las fibras eferentes olivococleares y las CCEs de la cóclea y, como se ha mostrado en la Parte I de este trabajo, a las del receptor presente en las CCIIs inmaduras. Esto ha llevado a proponer que la modulación eferente de la función coclear ocurre a través de la activación de nAChRs heteroméricos ensamblados a partir de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  (Elgoyhen *et al.*, 2001).

El estudio de las respuestas electrofisiológicas de las CCEs de la cóclea, resulta complicado por la presencia de una corriente de potasio ( $I_{K,n}$ ), que impide fijar el voltaje de estas células a potenciales hiperpolarizados. Esta corriente de potasio,  $I_{K,n}$ , está mediada por canales que contienen la subunidad KCNQ4 (Housley y Ashmore, 1992; Marcotti y Kros, 1999). La proteína KCNQ4 se expresa en gran cantidad en la membrana basolateral de las CCEs y la corriente a través de este canal constituye la conductancia principal de éstas células (Housley y Ashmore, 1992; Marcotti y Kros, 1999; Kharkovets *et al.*, 2000). En el potencial de reposo de la célula, la  $I_{K,n}$  provee una gran conductancia de potasio y por lo tanto, es esta corriente la encargada de determinar el potencial y la constante de tiempo de la membrana de las CCEs. Se sabe que las mutaciones en este

canal de potasio KCNQ4 estarían relacionadas con la pérdida de audición progresiva autosómica dominante que se conoce como DFNA2 (Kubisch *et al.*, 1999). La  $I_{K,n}$  también está presente en las CCI's adultas. Esta corriente está regulada durante el desarrollo de las CCI's y sólo contribuye al potencial de reposo de estas células a partir de los 19 días postnatal (Marcotti *et al.*, 2003b; Oliver *et al.*, 2003). Dado que la linopiridina (ver estructura en la *Figura 26*) es un antagonista de la  $I_{K,n}$ , con una  $CI_{50}$  cercana a  $1\mu M$  (Marcotti y Kros, 1999), se la ha utilizado en estudios de las respuestas colinérgicas de las CCEs. Esto es, se ha aplicado entre 10 a  $100\mu M$  de este compuesto, para estudiar las respuestas activadas por la ACh en las CCEs de la preparación aguda de cóclea (Lioudyno y Fuchs, comunicación personal; Oliver *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2001). Sin embargo, debido a que el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  es muy promiscuo en cuanto a los compuestos que lo bloquean (Elgoyhen *et al.*, 2001; Rothlin *et al.*, 2003), existe la posibilidad de que la linopiridina esté afectando la respuesta colinérgica de estas células. Por lo tanto, el objetivo de esta parte del trabajo fue estudiar si en efecto este compuesto era capaz de bloquear las respuestas activadas por la aplicación de la ACh en las células ciliadas y, además, estudiar el mecanismo de acción de esta droga sobre el receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  expresado en oocitos de *Xenopus laevis*.



**Figura 26: Estructura química de la linopiridina.** La nomenclatura IUPAC de la linopiridina es: 1,3-Dihidro-1-fenil-3,3-bis(4-piridinilmetil)-2H-indol-2-uno. También es conocida como DuP966.

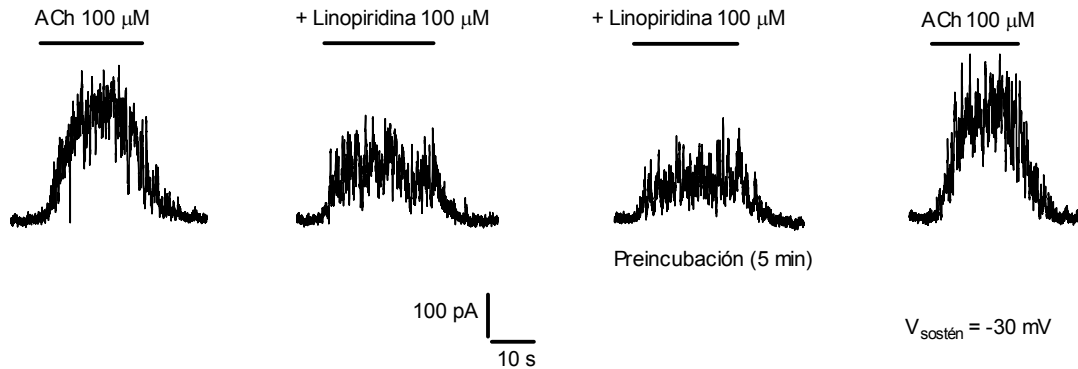
## Resultados

### *Efecto de la linopiridina sobre el nAChR de las células ciliadas de la cóclea de ratas.*

En la *Figura 27* se muestran registros representativos de las respuestas ante la aplicación exógena de ACh 100  $\mu\text{M}$  en CCEs de la preparación aguda del órgano de Corti de ratas de 3 a 4 semanas de edad. A un potencial de membrana de  $-30$  mV y, utilizando una solución intracelular que contenía KCl y EGTA, las corrientes evocadas por ACh fueron salientes ya que la salida de iones  $\text{K}^+$  a través de los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  predomina sobre la entrada de cationes a través del nAChR (Art *et al.*, 1984; Housley y Ashmore, 1991; Fuchs y Murrow, 1992a; Evans, 1996). Al aplicar linopiridina en una concentración de 100  $\mu\text{M}$  y en ausencia de la ACh, se observó una reducción en la corriente de sostén de  $16.8 \pm 1.3$  pA. Cuando se aplicó la linopiridina junto con ACh 100  $\mu\text{M}$ , las respuestas se redujeron en un  $34.5 \pm 3.3$  % ( $n=3$  células; los valores fueron corregidos por el efecto de la linopiridina sobre la corriente de sostén en cada célula). El bloqueo por la linopiridina se incrementó luego de preincubar a las CCEs con la droga durante 5 minutos ( $53.3 \pm 7.6$  %;  $n=3$  células). El efecto de la linopiridina se pudo revertir luego de lavar a la preparación con una solución extracelular normal durante 1 minuto.

Como se mencionó anteriormente, las respuestas activadas por la aplicación de ACh en las células ciliadas cocleares, resulta de la activación de nAChRs que contienen las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  y la subsiguiente apertura de los canales SK2, debido a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los nAChRs. Así, para estudiar el efecto de la linopiridina sobre el nAChR aislado, bloqueamos la corriente de  $\text{K}^+$  activada por  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando BAPTA en la solución intracelular y apamina, en la solución extracelular. Las respuestas a través del nAChR aislado se estudiaron en las CCI de ratas en P9-P11 debido a que estas células inmaduras poseen una menor conductancia de potasio en el reposo y, por lo tanto, se obtiene una mayor relación señal/ruido que la que se obtiene en las CCEs de 3 a 4 semanas de edad. En la *Figura 28A* se muestran registros representativos de las respuestas obtenidas ante la aplicación de ACh 30  $\mu\text{M}$  y, el bloqueo de las mismas en presencia de distintas concentraciones de linopiridina. Como puede observarse en los registros representativos de la *Figura 28A* y en la curva de inhibición que se muestra en la *Figura 28B*, el bloqueo por esta droga fue dependiente de la concentración. La

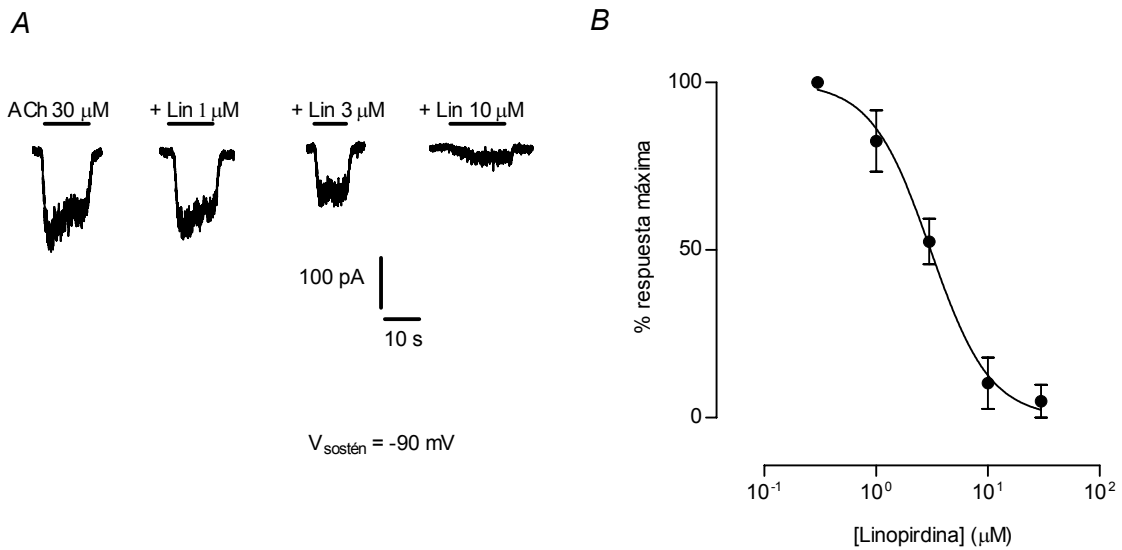
concentración de linopiridina requerida para bloquear el 50 % la respuesta a la ACh 30  $\mu\text{M}$  ( $\text{CI}_{50}$ ), fue de  $3.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$ , con un coeficiente de Hill ( $n_H$ ) de  $1.5 \pm 0.3$  ( $n= 3-6$  células). El bloqueo ejercido por la linopiridina fue completamente reversible luego de lavar a las células durante 40 segundos con la solución extracelular control.



**Figura 27: Efecto de la linopiridina sobre las corrientes combinadas ( $n\text{AChR} + \text{SK}$ ) producidas por la ACh en las CCEs.** Registros representativos de las respuestas producidas por ACh 100  $\mu\text{M}$  tanto en ausencia como en presencia de linopiridina 100  $\mu\text{M}$  ( $n=3$  células). La corriente de sostén fue de  $-17.5 \text{ pA}$ . La linopiridina fue coaplicada con la ACh o, donde se indica, preincubada durante 5 minutos antes de la aplicación del agonista. En la preincubación, la corriente de sostén cambió a  $-34.5 \text{ pA}$ . Los experimentos se llevaron a cabo en CCEs de ratas en P21-P27 sostenidas a un potencial de membrana de  $-30 \text{ mV}$ . La solución intracelular contenía KCl-EGTA.

#### *Efecto de la linopiridina sobre el $n\text{AChR}$ recombinante $\alpha 9\alpha 10$ expresado en oocitos de *Xenopus laevis*.*

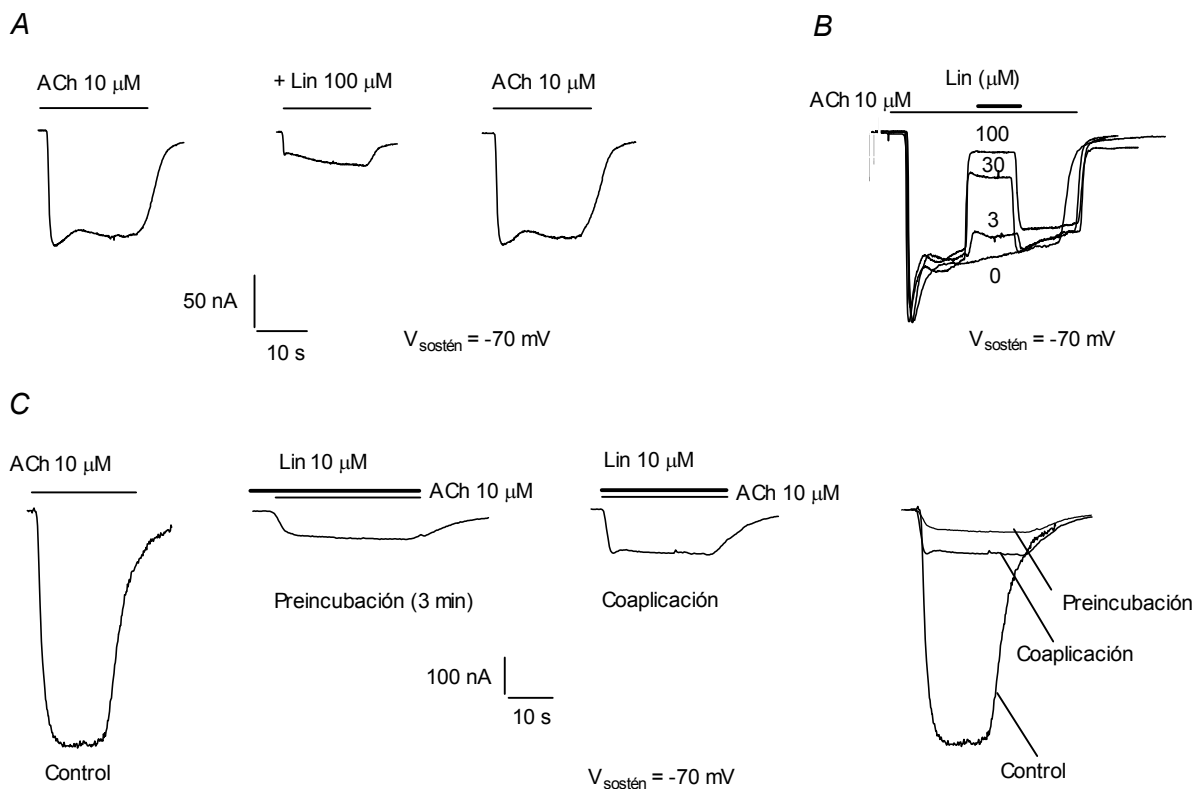
Estudiamos el efecto de la linopiridina sobre el receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  expresado en oocitos de *Xenopus laevis*, ya que este sistema nos permite realizar un estudio más detallado del mecanismo de bloqueo mediado por esta droga. En la *Figura 29A* se observa que la linopiridina en una concentración de 100  $\mu\text{M}$  bloqueó las respuestas activadas por la ACh 10  $\mu\text{M}$  en oocitos inyectados con las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  en un  $83 \pm 2.1 \%$  ( $n=3$  células). Este efecto fue rápidamente reversible ya que se pudo recuperar el  $99.2 \pm 8.8 \%$  de la respuesta inicial a la ACh, luego de lavar a los oocitos con una solución salina normal durante 3 minutos. Cuando se aplicó la linopiridina durante una exposición prolongada a la ACh 10  $\mu\text{M}$ , observamos que este



**Figura 28: Efecto de la linopiridina sobre el nAChR nativo de las CClIs.** *A*, registros representativos de las respuestas obtenidas en el nAChR aislado ante la aplicación de ACh 30 μM tanto en ausencia como en presencia de linopiridina 1, 3, o 10 μM. La corriente de sostén fue de -152 pA. *B*, curva de inhibición que resultó de la aplicación de ACh 30 μM con concentraciones crecientes de linopiridina. La preparación se preincubó con el antagonista durante 3 minutos previos a la aplicación del agonista. Las amplitudes de las corrientes activadas por la ACh en presencia de las distintas concentraciones de linopiridina fueron normalizadas a los valores obtenidos en ausencia de esta droga. La linopiridina bloqueó al nAChR nativo de las CClIs con una  $CI_{50}$  de  $3.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ,  $n_H = 1.5 \pm 0.3$ . Los datos fueron promediados de 3 a 6 CClIs de ratas en P9-P11. Todos los experimentos se llevaron a cabo en CClIs sostenidas a un potencial de membrana de -90 mV.

efecto de bloqueo sobre el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  fue muy rápido (*Figura 29B*). El curso temporal del inicio y decaimiento del bloqueo ejercido por las distintas concentraciones de linopiridina fue idéntico al de las respuestas a la ACh sola. Sin embargo, debido a que el sistema de perfusión que utilizamos es muy lento, es probable que éste sea el limitante de la velocidad en ambos casos.

Al coaplicar ACh con linopiridina 10 μM, se obtuvo un bloqueo del  $80 \pm 2 \%$  ( $n=3$  células); mientras que, al preincubar durante 3 minutos a los oocitos con esta misma concentración de linopiridina, sólo se observó un pequeño aumento en el porcentaje de bloqueo por esta droga ( $88 \pm 2 \%$ ;  $n=3$  células,  $p < 0.05$ , *Figura 29C*). Debido a que la magnitud del bloqueo no cambió en forma significativa, los experimentos que se muestran a continuación fueron realizados coaplicando la linopiridina con la ACh sin preincubar con el antagonista.

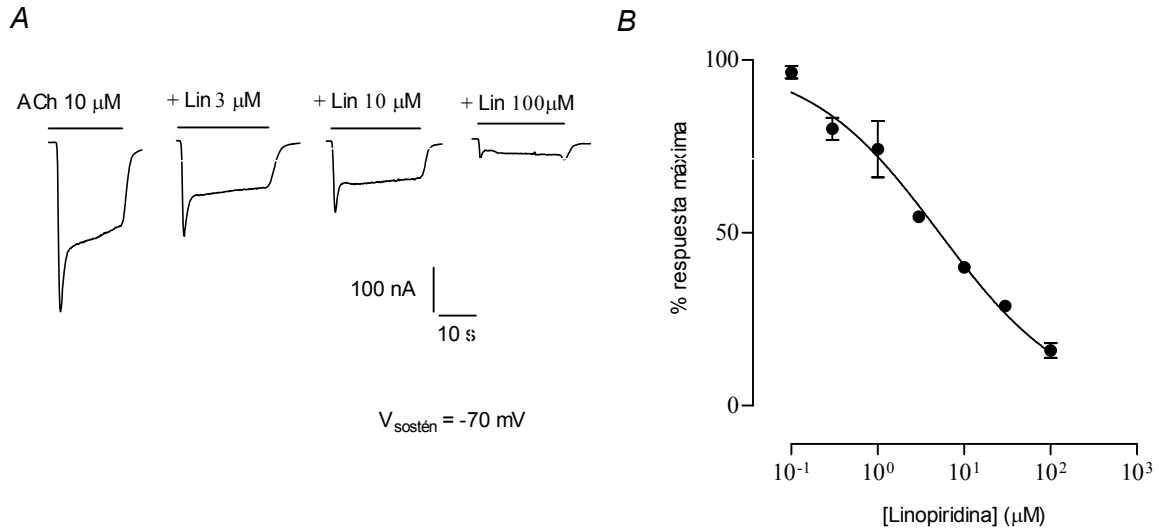


**Figura 28: Efecto de la linopiridina sobre las respuestas activadas por la ACh en oocitos que expresan el receptor  $\alpha 9\alpha 10$ .** *A*, registros representativos de las respuestas obtenidas ante la aplicación de ACh 10  $\mu\text{M}$  tanto en ausencia como en presencia de linopiridina 100  $\mu\text{M}$ , o después del lavado de los oocitos con una solución salina normal durante 3 minutos. *B*, aplicación de diferentes concentraciones de linopiridina durante la respuesta a ACh 10  $\mu\text{M}$ . Este gráfico muestra que el inicio y el decaimiento del bloqueo por la linopiridina fue muy rápido. *C*, registros representativos de las respuestas obtenidas ante la aplicación de ACh 10  $\mu\text{M}$  tanto en ausencia como en presencia de linopiridina 10  $\mu\text{M}$ . La linopiridina fue coaplicada con la ACh o, donde se indica, aplicada durante 3 minutos previos a la aplicación del agonista. Los registros son representativos de 3 oocitos en todos los casos. Todos los experimentos se llevaron a cabo en oocitos sostenidos a un potencial de membrana de  $-70$  mV.

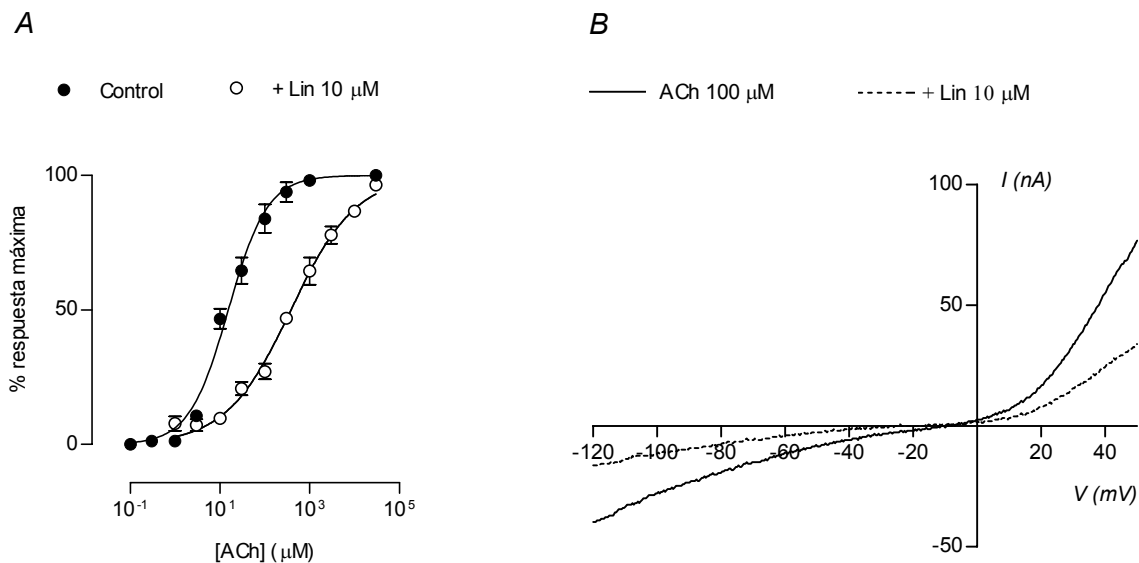
En la *Figura 30* se muestra que el bloqueo por la linopiridina fue dependiente de la concentración utilizada. La concentración de la linopiridina requerida para bloquear el 50 % de la respuesta a la ACh 10  $\mu\text{M}$  ( $CI_{50}$ ), fue de  $5.2 \pm 0.2$   $\mu\text{M}$ , con un  $n_H$  de  $0.6 \pm 0.04$  ( $n=3$  células). Este valor de  $CI_{50}$  es similar al obtenido para el nAChR nativo presente en la base de las CCI (*Figura 28*).



Para estudiar el mecanismo de bloqueo de la linopiridina sobre el receptor recombinante heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ , analizamos el efecto de esta droga en distintas concentraciones de ACh y a un potencial de membrana de  $-70$  mV. Como se puede observar en la *Figura 30A*, la linopiridina a una concentración de  $10 \mu\text{M}$  produjo un corrimiento significativo de la curva de concentración-respuesta para la ACh hacia concentraciones mayores, sin una reducción en la respuesta máxima al agonista. El valor  $\text{CE}_{50}$  del nAChR recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  por la ACh fue de  $15.4 \pm 0.8 \mu\text{M}$  ( $n=6$  células), mientras que, el valor de  $\text{CE}_{50}$  en presencia de la linopiridina  $10 \mu\text{M}$  fue de  $382.5 \pm 6.7 \mu\text{M}$  ( $n=6$  células). Ambas curvas fueron normalizadas con respecto a la respuesta máxima a la ACh para cada célula. Este resultado es compatible con un mecanismo de bloqueo del tipo competitivo. Luego, se analizó si el bloqueo por la linopiridina era dependiente del potencial de la membrana. Para esto realizamos curvas de corriente en función del voltaje ( $I-V$ ), de  $-120$  a  $+50$  mV, en presencia y ausencia de linopiridina  $10 \mu\text{M}$  (*Figura 30B*). Como puede observarse en el gráfico, el bloqueo que ejerce la linopiridina sobre las corrientes activadas por la ACh fue independiente del voltaje. Esto es, las corrientes se redujeron en la misma magnitud tanto a potenciales despolarizados como hiperpolarizados ( $I_{\text{linopiridina}}/I_{\text{control}} = 41.7 \pm 5.2 \%$  y  $44.7 \pm 6.3 \%$  a  $-90$  y  $+40$  mV, respectivamente;  $n=3$  células).



**Figura 29: Efecto de la linopiridina sobre el nAChR recombinante  $\alpha 9\alpha 10$ .** A, registros representativos de las respuestas obtenidas ante la aplicación de ACh 10  $\mu\text{M}$  tanto en ausencia como en presencia de linopiridina 3, 10 y 100  $\mu\text{M}$ . B, curva de inhibición obtenida en presencia de ACh 10  $\mu\text{M}$  y concentraciones crecientes de linopiridina. Las amplitudes de las corrientes activadas por la ACh en presencia de las distintas concentraciones del antagonista fueron normalizadas a los valores obtenidos en ausencia del mismo. La linopiridina bloqueó al nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  con una  $CI_{50}$  de  $5.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ,  $n_H = 0.6 \pm 0.04$ . Los datos fueron promediados de 3 oocitos. Todos los experimentos se llevaron a cabo en oocitos sostenidos a un potencial de membrana de  $-70 \text{ mV}$ .



**Figura 30: Mecanismo de bloqueo de la linopiridina.** A, curvas de concentración–respuesta a la ACh tanto en presencia como en ausencia de linopiridina 10  $\mu\text{M}$ . Los valores de corriente fueron normalizados y referidos a la respuesta máxima a la ACh. Los datos fueron promediados de 6 oocitos. Todos los experimentos se llevaron a cabo en oocitos sostenidos a un potencial de membrana de  $-70 \text{ mV}$ . B, curvas  $I-V$  representativas obtenidas al aplicar una rampa de voltaje de 2 segundos (de  $-120$  a  $+50 \text{ mV}$ ) a los 10 segundos del máximo de la respuesta obtenida por la aplicación de ACh 10  $\mu\text{M}$  tanto en presencia como en ausencia de linopiridina 10  $\mu\text{M}$  en oocitos que expresan el receptor  $\alpha 9\alpha 10$  ( $n=3$  células).

## Discusión

### *Efecto de la linopiridina sobre el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ nativo y recombinante.*

En esta parte del trabajo mostramos que la linopiridina, un antagonista clásico de la corriente de potasio  $I_{K,n}$ , presente en células ciliadas de la cóclea (Housley y Ashmore, 1992), y de la corriente de potasio  $I_M$ , presente en neuronas del sistema nervioso central y periférico (Costa y Brown, 1997; Lamas *et al.*, 1997), es capaz de bloquear tanto al nAChR nativo de las células ciliadas de la cóclea, como al nAChR recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  expresado en oocitos de *Xenopus laevis*. La interacción de la linopiridina con estos nAChRs es tan eficiente como la que se observó para las corrientes de potasio  $I_{K,n}$  e  $I_M$ . La concentración requerida para bloquear el 50 % de la respuesta a la ACh ( $CI_{50}$ ), fue de 5  $\mu M$  para el nAChR recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  y de 3  $\mu M$  para el nativo, valores que se encuentran en el mismo orden de magnitud (micromolar) que los reportados para las corrientes nativas  $I_{K,n}$  e  $I_M$  (Costa y Brown, 1997; Lamas *et al.*, 1997; Marcotti y Kros, 1999). El bloqueo del receptor recombinante  $\alpha 9\alpha 10$  por la linopiridina también se encuentra en el mismo rango de concentraciones que las que se requieren para bloquear a los canales recombinantes formados por las subunidades clonadas KCNQ2 y KCNQ3 (Wang *et al.*, 1998). Sin embargo, la linopiridina ejerce un bloqueo más potente sobre los nAChRs recombinantes  $\alpha 9\alpha 10$  que sobre los canales recombinantes compuestos por la subunidad KCNQ4 (un 30 % de bloqueo a una concentración de 200  $\mu M$ ) (Kubisch *et al.*, 1999). Así, a las concentraciones usadas para estudiar las respuestas colinérgicas de las células ciliadas en las preparaciones de órgano de Corti, esto es, de 10 a 100  $\mu M$  (Lioudyno y Fuchs, comunicación personal; Oliver *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2001), la linopiridina estaría interfiriendo con estas respuestas.

Debido a que la linopiridina es un inhibidor de canales de potasio, se podría especular que el bloqueo de las respuestas colinérgicas de las células ciliadas podría deberse a que la misma está bloqueando al canal de potasio acoplado SK2. En este trabajo no examinamos si existe un efecto directo de la linopiridina sobre los canales SK2 en la preparación del órgano de Corti. Sin embargo, esta droga no produce ningún efecto sobre las corrientes de potasio activadas por  $Ca^{2+}$ -sensibles a apamina en neuronas del ganglio cervical superior de ratas (Lamas *et al.*, 1997). Además, estos experimentos realizados

sobre las corrientes colinérgicas aisladas y sobre los receptores recombinantes, muestran claramente que la linopiridina puede interactuar directamente con los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ . Aún así, no podemos descartar la posibilidad de que esta droga también esté afectando a los canales SK2.

El hecho de que la linopiridina sea un antagonista de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ , no fue totalmente inesperado. Se ha observado que la linopiridina, además de bloquear las corrientes de potasio de tipo M en las células del ganglio simpático superior de ratas, bloquea canales activados por ligando en esas células, como por ejemplo, nAChRs y receptores de GABA<sub>A</sub> con una CI<sub>50</sub> de 8 y 26  $\mu$ M, respectivamente (Lamas *et al.*, 1997). Asimismo, se ha propuesto que la linopiridina tiene influencia sobre varios procesos que son particulares de las neuronas colinérgicas (Vickroy, 1993). Por ejemplo, la linopiridina facilita la liberación de [<sup>3</sup>H]ACh provocada por alto K<sup>+</sup> y por Ca<sup>2+</sup>, a partir de sinaptosomas colinérgicos de hipocampo y provoca una estimulación prolongada dependiente del Ca<sup>2+</sup> de la recaptación de [<sup>3</sup>H]colina y de la formación de [<sup>3</sup>H]ACh (Vickroy, 1993). Además, la linopiridina incrementa la liberación de ACh evocada por alto K<sup>+</sup> en rodajas de cerebro (Nicholson, 1990), bloquea la actividad de la acetilcolinesterasa en homogenatos de corteza cerebral de ratas (Nicholson, 1990) y activa la transmisión sináptica en la placa neuromuscular a través de un efecto de facilitación (Tsai *et al.*, 1992). En este trabajo examinamos sólo los efectos de la aplicación de ACh en forma exógena, pero debería en un futuro considerarse el estudio del efecto de la linopiridina sobre la liberación sináptica de ACh a partir de los terminales eferentes.

La expresión del nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  en oocitos de *Xenopus laevis* nos permitió realizar un estudio más detallado sobre el mecanismo de interacción de la linopiridina con este receptor y así complementar los resultados obtenidos con el receptor nativo en la preparación de cóclea. Se ha observado que el bloqueo de la corriente de K<sup>+</sup> I<sub>M</sub> por la linopiridina se debe a un bloqueo directo sobre el canal abierto (Costa y Brown, 1997; Lamas *et al.*, 1997). Sin embargo, esta droga no parece actuar como un bloqueante del poro sobre el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$ . Esta conclusión se ve reforzada por la observación de que el bloqueo por la linopiridina es independiente del potencial de membrana y por el hecho de que la misma fue incapaz de bloquear las respuestas activadas por altas

concentraciones de ACh. Este último resultado sugiere que este compuesto estaría actuando como un antagonista al competir por el sitio de unión a la ACh.

*Conclusión.*

En este apartado demostramos que el antagonista clásico de la  $I_{K,n}$ , bloquea a los nAChRs de las células ciliadas con la misma potencia que la que se encontró para los antagonistas típicos muscarínicos, como la atropina, y nicotínicos, como la nicotina (Elgoyhen *et al.*, 2001). La similitud encontrada hasta el momento en la farmacología del nAChR recombinante ensamblado a partir de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  (Elgoyhen *et al.*, 1994; Elgoyhen *et al.*, 2001) y la del receptor nativo presente tanto en las CCEs aisladas de distintas especies (Housley y Ashmore, 1991; Fuchs y Murrow, 1992a; Kakehata *et al.*, 1993; Erostequi *et al.*, 1994a; Blanchet *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1996; Dulong y Lenoir, 1996; Evans, 1996; McNiven *et al.*, 1996), como en las CCI de la preparación de cóclea de rata (Parte I y Parte III de esta tesis), refuerzan la hipótesis de que el receptor colinérgico nativo de las células ciliadas está compuesto por las subunidades nicotínicas  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ .

## Conclusiones

- ✓ El perfil farmacológico y las características biofísicas del receptor nativo de las CCIIs son idénticos a los descritos para el nAChR recombinante heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$ , lo que nos permite concluir que el nAChR nativo está compuesto por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ .
- ✓ El nAChR nativo de las CCIIs tiene un alto valor de permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , consistente con su función fisiológica que es la de servir como una vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las células para activar canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- ✓ El  $\text{Ca}^{2+}$  ejerce un efecto bifásico sobre el receptor nativo de las CCIIs a concentraciones fisiológicas: potenciación y bloqueo. La potenciación se evidencia por un incremento en la afinidad aparente por la ACh, sugiriendo que el  $\text{Ca}^{2+}$  interacciona con sitios alostéricos extracelulares para modular el acople entre la unión del agonista y la apertura del canal. El bloqueo, en cambio, es dependiente del voltaje, sugiriendo que el o los sitios de acción del  $\text{Ca}^{2+}$  se encontrarían en el poro del canal, y resultaría del proceso de permeación.
- ✓ Las sinapsis eferentes olivococleares-CCIIs son funcionales desde P3 y continúan transmitiendo hasta P13-14. Luego de P14, las CCIIs no responden a la ACh aplicada en forma exógena o liberada sinápticamente, lo que sugiere una pérdida de nAChRs funcionales.
- ✓ Existe una correlación entre la actividad colinérgica de las CCIIs y la expresión de la subunidad  $\alpha 10$  durante la maduración postnatal.
- ✓ La dependencia del voltaje de las respuestas producidas por la ACh demuestra que los nAChR y los canales SK2 están acoplados desde P3 hasta P13-14.

- ✓ En P13-14, las corrientes sinápticas presentan constantes cinéticas más rápidas y menor amplitud, lo cual sugiere que podría haber una disminución entre el acople de los nAChRs y los canales SK2 y/o una disminución en la expresión de los SK2. La disminución en la expresión del canal SK2 luego del comienzo de la audición es consistente con estos resultados.
  
- ✓ En P3 y P13-14 sólo el 63% y el 43%, respectivamente, de las CCI's que presentan respuestas producidas por la ACh exógena, reciben contactos sinápticos funcionales. Esto muestra que existen nAChRs funcionales previo a la llegada de la inervación eferente y sugiere que la disminución en la expresión de  $\alpha 10$  luego del comienzo de la audición estaría regulada por la actividad sináptica.
  
- ✓ La linopiridina, antagonista clásico de la  $I_{K,n}$ , bloquea a los nAChRs de las células ciliadas y al recombinante heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  con la misma potencia. El bloqueo es independiente del potencial de membrana e involucra cambios en la afinidad aparente del receptor por la ACh, consistente con un mecanismo de tipo competitivo.

## **Bibliografia**

- Amador M, Dani JA (1995) Mechanism for modulation of nicotinic acetylcholine receptors that can influence synaptic transmission. *J Neurosci* 15:4525-4532.
- Anand R, Conroy W, Schoepfer R, Whiting P, Lindstrom J (1991) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *J Biol Chem* 266:11192-11198.
- Art JJ, Fettiplace R, Fuchs PA (1984) Synaptic hyperpolarization and inhibition of turtle cochlear hair cells. *J Physiol* 356:525-550.
- Ashmore JF (1987) A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. *J Physiol* 388:323-347.
- Augustine GJ, Charlton MP (1986) Calcium dependence of presynaptic calcium current and post-synaptic response at the squid giant synapse. *J Physiol* 381:619-640.
- Bertrand D, Ballivet M, Rungger D (1990) Activation and blocking of neuronal nicotinic acetylcholine receptor reconstituted in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1993-1997.
- Bertrand D, Galzi J, Devillers-Thierry A, Bertrand S, Changeux J (1993) Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal  $\alpha 7$  nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6971-6975.
- Bertrand D, Devillers-Thierry A, Revah F, Galzi JL, Hussy N, Mulle C, Bertrand S, Ballivet M, Changeux JP (1992) Unconventional pharmacology of a neuronal nicotinic receptor mutated in the channel domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1261-1265.
- Beutner D, Moser T (2001) The presynaptic function of mouse cochlear inner hair cells



- during development of hearing. *J Neurosci* 21:4593-4599.
- Blanchet C, ErosteGUI C, Sugasawa M, Dulon D (1996) Acetylcholine-induced potassium current of guinea pig outer hair cells: its dependence on a calcium influx through nicotinic-like receptors. *J Neurosci* 16:2574-2584.
- Blanchet C, ErosteGUI C, Sugasawa M, Dulon D (2000) Gentamicin blocks ACh-evoked K<sup>+</sup> current in guinea-pig outer hair cells by impairing Ca<sup>2+</sup> entry at the cholinergic receptor. *J Physiol* 525 Pt 3:641-654.
- Bonfante-Cabarcas R, Swanson KL, Alkondon M, Albuquerque EX (1996) Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. IV. Regulation by external Ca<sup>2+</sup> of alpha-bungarotoxin-sensitive receptor function and of rectification induced by internal Mg<sup>2+</sup>. *J Pharmacol Exp Ther* 277:432-444.
- Booker TK, Smith KW, Dodrill C, Collins AC (1998) Calcium modulation of activation and desensitization of nicotinic receptors from mouse brain. *J Neurochem* 71:1490-1500.
- Boorman JP, Groot-Kormelink PJ, Sivilotti LG (2000) Stoichiometry of human recombinant neuronal nicotinic receptors containing the  $\beta$ 3 subunit expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 529 Pt 3:565-577.
- Boton R, Dascal N, Gillo B, Lass Y (1989) Two calcium-activated chloride conductances in *Xenopus laevis* oocytes permeabilized with the ionophore A23187. *J Physiol* 408:511-534.
- Brandt A, Striessnig J, Moser T (2003) Cav1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 23:10832-10840.
- Bregestovski PD, Miledi R, Parker I (1979) Calcium conductance of acetylcholine-induced endplate channels. *Nature* 279:638-639.

- Brown EM, Vassilev PM, Hebert SC (1995) Calcium ions as extracellular messengers. *Cell* 83:679-682.
- Brownell WE (1984) Microscopic observation of cochlear hair cell motility. *Scan Electron Microsc*:1401-1406.
- Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, de Ribaupierre Y (1985) Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227:194-196.
- Burnashev N (1996) Calcium permeability of glutamate-gated channels in the central nervous system. *Current Opinion in Neurobiol* 6:311-317.
- Cabelli RJ, Hohn A, Shatz CJ (1995) Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-4/5 or BDNF. *Science* 267:1662-1666.
- Callister RJ, Keast JR, Sah P (1997)  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in rat otic ganglion cells: role of  $Ca^{2+}$  entry via  $Ca^{2+}$  channels and nicotinic receptors. *J Physiol* 500 Pt 3:571-582.
- Cartier GE, Yoshikami D, Gray WR, Luo S, Olivera BM, McIntosh JM (1996) A new alpha-conotoxin which targets alpha3beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 271:7522-7528.
- Castro NG, Albuquerque EX (1995) alpha-Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. *Biophys J* 68:516-524.
- Chang HW, Neumann E (1976) Dynamic properties of isolated acetylcholine receptor proteins: release of calcium ions caused by acetylcholine binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:3364-3368.
- Chen C, LeBlanc C, Bobbin R (1996) Differences in cholinergic responses from outer hair cells of rat and guinea pig. *Hearing Research* 98:9-17.

- Cooper E, Couturier S, Ballivet M (1991) Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 350:235-238.
- Corey DP, Hudspeth AJ (1979) Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell. *Nature* 281:675-677.
- Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:431-458.
- Corriveau RA, Romano SJ, Conroy WG, Oliva L, Berg DK (1995) Expression of neuronal acetylcholine receptor genes in vertebrate skeletal muscle during development. *J Neurosci* 15:1372-1383.
- Costa AM, Brown BS (1997) Inhibition of M-current in cultured rat superior cervical ganglia by linopirdine: mechanism of action studies. *Neuropharmacology* 36:1747-1753.
- Dale HH (1914) The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther* 6:147-190.
- Dallos P (1992) The active cochlea. *J Neurosci* 12:4575-4585.
- Dallos P, Popper AN, Fay RR (1996) The Cochlea. *Springer-Verlag, New York*.
- Decker ER, Dani JA (1990) Calcium permeability of the nicotinic acetylcholine receptor: the single-channel calcium influx is significant. *J Neurosci* 10:3413-3420.
- Doi T, Ohmori H (1993) Acetylcholine increases intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and hyperpolarizes the guinea-pig outer hair cell. *Hearing Research* 67:179-188.
- Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392:933-936.

- Dulon D, Lenoir M (1996) Cholinergic responses in developing outer hair cells of the rat cochlea. *Eur J Neurosci* 8:1945-1952.
- Dulon D, Luo L, Zhang C, Ryan AF (1998) Expression of small-conductance calcium-activated potassium channels (SK) in outer hair cells of the rat cochlea *Eur J Neurosci* 10:907-915.
- Eatock RA, Hurley KM (2003) Functional development of hair cells. *Curr Top Dev Biol* 57:389-448.
- Eddins D, Lyford LK, Lee JW, Desai SA, Rosenberg RL (2002) Permeant but not impermeant divalent cations enhance activation of nondesensitizing alpha 7 nicotinic receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C796-804.
- Eisele JL, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Changeux JP, Bertrand D (1993) Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 366:479-483.
- Elgoyhen A, Vetter D, Katz E, Rothlin C, Heinemann S, Boulter J (2001) Alpha 10: A determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3501-3506.
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S (1994)  $\alpha 9$ : an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79:705-715.
- Ellison M, Haberlandt C, Gomez-Casati ME, Watkins M, Elgoyhen AB, McIntosh JM, Olivera BM (2006) Alpha-RgIA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the alpha9alpha10 nAChR. *Biochemistry* 45:1511-1517.
- Emmerling MR, Sobkowicz HM, Levenick CV, Scott GL, Slapnick SM, Rose JE (1990) Biochemical and morphological differentiation of acetylcholinesterase-positive

- efferent fibers in the mouse cochlea. *J Electron Microsc Tech* 15:123-143.
- Erkman L, McEvilly RJ, Luo L, Ryan AK, Hooshmand F, O'Connell SM, Keithley EM, Rapaport DH, Ryan AF, Rosenfeld MG (1996) Role of transcription factors Brn-3.1 and Brn-3.2 in auditory and visual system development. *Nature* 381:603-606.
- Erostequi C, Norris CH, Bobbin RP (1994a) In vitro pharmacologic characterization of a cholinergic receptor on outer hair cells. *Hearing Research* 74:135-147.
- Erostequi C, Nenov AP, Norris CH, Bobbin RP (1994b) Acetylcholine activates a K<sup>+</sup> conductance permeable to Cs<sup>+</sup> in guinea pig outer hair cells. *Hearing Research* 81:119-129.
- Evans M (1996) Acetylcholine activates two currents in guinea-pig outer hair cells. *J Physiol* 491:563-578.
- Eybalin M (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73:309-373.
- Fenster CP, Rains MF, Noerager B, Quick MW, Lester RA (1997) Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *J Neurosci* 17:5747-5759.
- Fieber LA, Adams DJ (1991) Acetylcholine-evoked currents in cultured neurones dissociated from rat parasympathetic cardiac ganglia. *J Physiol* 434:215-237.
- Forsayeth J, Kobrin E (1997) Formation of oligomers containing the beta3 and beta4 subunits of the rat nicotinic receptor. *J Neurosci* 17:1531-1538.
- Franchini LF, Elgoyhen AB (2006) Adaptive evolution in mammalian proteins involved in cochlear outer hair cell electromotility. *Mol Phylogenet Evol* (en prensa).

- Frings S (1997) Cyclic nucleotide-gated channels and calcium: an intimate relation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31:75-82.
- Frings S, Seifert R, Godde M, Kaupp UB (1995) Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 15:169-179.
- Frolenkov GI, Belyantseva IA, Friedman TB, Griffith AJ (2004) Genetic insights into the morphogenesis of inner ear hair cells. *Nat Rev Genet* 5:489-498.
- Fuchs P (1996) Synaptic transmission at vertebrate hair cells. *Current Opinion in Neurobiol* 6:514-519.
- Fuchs PA, Murrow BW (1992a) A novel cholinergic receptor mediates inhibition of chick cochlear hair cells. *Proc. R. Soc. Lond. B* 248:35-40.
- Fuchs PA, Murrow BW (1992b) Cholinergic inhibition of short (outer) hair cells of the chick's cochlea. *J Neurosci* 12:800-809.
- Fuchs PA, Parsons TD (2006) The synaptic physiology of hair cells: *Vertebrate Hair Cells* (Fay RR, Popper AR, eds), Springer-Verlag, New York pp 249-312.
- Fucile S, Sucapane A, Eusebi F (2006) Ca<sup>2+</sup> permeability through rat cloned alpha9-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 39:349-355.
- Fucile S, Palma E, Mileo AM, Miledi R, Eusebi F (2000) Human neuronal threonine-for-leucine-248 alpha 7 mutant nicotinic acetylcholine receptors are highly Ca<sup>2+</sup> permeable. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3643-3648.
- Galzi JL, Bertrand S, Corringer PJ, Changeux JP, Bertrand D (1996) Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Embo J* 15:5824-5832.

- Gerzanich V, Anand R, Lindstrom J (1994) Homomers of alpha 8 and alpha 7 subunits of nicotinic receptors exhibit similar channel but contrasting binding site properties. *Mol Pharmacol* 45:212-220.
- Gerzanich V, Wang F, Kuryatov A, Lindstrom J (1998) alpha 5 Subunit alters desensitization, pharmacology, Ca<sup>2+</sup> permeability and Ca<sup>2+</sup> modulation of human neuronal alpha 3 nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 286:311-320.
- Gillespie P (1995) Molecular machinery of auditory and vestibular transduction. *Current Opinion in Neurobiol* 5:449-555.
- Gil-Loyzaga P, Pujol R (1988) Synaptophysin in the developing cochlea. *Int J Dev Neurosci* 6:155-160.
- Ginzberg RD, Morest DK (1984) Fine structure of cochlear innervation in the cat. *Hearing Research* 14:109-127.
- Glowatzki E, Fuchs PA (2000) Cholinergic synaptic inhibition of inner hair cells in the neonatal mammalian cochlea. *Science* 288:2366-2368.
- Glowatzki E, Wild K, Brandle U, Fakler G, Fakler B, Zenner HP, Ruppersberg JP (1995) Cell-specific expression of the alpha 9 nACh receptor subunit in auditory hair cells revealed by single-cell RT-PCR. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 262:141-147.
- Grando SA (2000) Autoimmunity to keratinocyte acetylcholine receptors in pemphigus. *Dermatology* 201:290-295.
- Groot-Kormelink PJ, Boorman JP, Sivilotti LG (2001) Formation of functional alpha3beta4alpha5 human neuronal nicotinic receptors in *Xenopus oocytes*: a reporter mutation approach. *Br J Pharmacol* 134:789-796.
- Gu X, Spitzer NC (1995) Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by

- frequency of spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  transients. *Nature* 375:784-787.
- Guinan JJ (1996) Efferent Physiology: *The Cochlea* (Dallos P, Popper AN, Fay RR, eds) Springer-Verlag, New York pp 435-502.
- Guinan JJ, Warr WB, Norris BE (1983) Differential olivocochlear projections from lateral vs medial zones of the superior olivary complex. *J Comp Neurol* 221:358-370.
- Hall ZW, Sanes JR (1993) Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell* 72 Suppl:99-121.
- He DZ, Dallos P (1999) Development of acetylcholine-induced responses in neonatal gerbil outer hair cells. *J Neurophysiol* 81:1162-1170.
- Hiel H, Elgoyhen AB, Drescher D, Morley B (1996) Expression of nicotinic acetylcholine receptor mRNA in the adult rat peripheral vestibular system. *Brain Res* 738:347-352.
- Holley MC (1996) Outer Hair Cell Motility. *The Cochlea* (Dallos P, Popper AN, Fay RR, eds) Springer-Verlag, New York pp 386-434.
- Hosey MM (1992) Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *FASEB J* 6:845-852.
- Housley GD, Ashmore JF (1991) Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 244:161-167.
- Housley GD, Ashmore JF (1992) Ionic currents of outer hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *J Physiol* 448:73-98.



- Hucho F, Oberthur W, Lottspeich F (1986) The ion channel of the nicotinic acetylcholine receptor is formed by the homologous helices M II of the receptor subunits. *FEBS Lett* 205:137-142.
- Hudspeth AJ (1985) The cellular basis of hearing: the biophysics of hair cells. *Science* 230:745-752.
- Ifune CK, Steinbach JH (1991) Voltage-dependent block by magnesium of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels in rat pheochromocytoma cells. *J Physiol* 443:683-701.
- Jan LY, Jan YN (1976) L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *J Physiol* 262:215-236.
- Jaramillo F (1995) Signal transduction in hair cells and its regulation by calcium. *Neuron* 15:1227-1230.
- Jones MV, Westbrook GL (1996) The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci* 19:96-101.
- Jones S, Sudweeks, S. and Yakel, J. (1999) Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci* 22:555-561.
- Kakehata S, Nakagawa T, Takasaka T, Akaike N (1993) Cellular mechanism of acetylcholine-induced response in dissociated outer hair cells of guinea-pig cochlea. *J Physiol* 463:227-244.
- Karlin A (1993) Structure of nicotinic acetylcholine receptors. *Current Opinion in Neurobiol* 3:299-309.
- Karlin A (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3:102-114.

- Katz E, Verbitsky M, Rothlin CV, Vetter DE, Heinemann SF, Belen Elgoyhen A (2000) High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor. *Hearing Research* 141:117-128.
- Katz E, Elgoyhen AB, Gomez-Casati ME, Knipper M, Vetter DE, Fuchs PA, Glowatzki E (2004) Developmental regulation of nicotinic synapses on cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 24:7814-7820.
- Kharkovets T, Hardelin JP, Safieddine S, Schweizer M, El-Amraoui A, Petit C, Jentsch TJ (2000) KCNQ4, a K<sup>+</sup> channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4333-4338.
- Knipper M, Zimmermann U, Rohbock K, Kopschall I, Zenner HP (1995) Synaptophysin and GAP-43 proteins in efferent fibers of the inner ear during postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res* 89:73-86.
- Knipper M, Kopschall I, Rohbock K, Kopke AK, Bonk I, Zimmermann U, Zenner H (1997) Transient expression of NMDA receptors during rearrangement of AMPA-receptor-expressing fibers in the developing inner ear. *Cell Tissue Res* 287:23-41.
- Kohler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, Adelman JP (1996) Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273:1709-1714.
- Kros CJ, Crawford AC (1990) Potassium currents in inner hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *J Physiol* 421:263-291.
- Kros CJ, Ruppersberg JP, Rusch A (1998) Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature* 394:281-284.
- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lutjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C,

- Jentsch TJ (1999) KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96:437-446.
- Kumar P, Meizel S (2005) Nicotinic acetylcholine receptor subunits and associated proteins in human sperm. *J Biol Chem* 280:25928-25935.
- Lamas JA, Selyanko AA, Brown DA (1997) Effects of a cognition-enhancer, linopirdine (DuP 996), on M-type potassium currents  $IK_M$  and some other voltage- and ligand-gated membrane currents in rat sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 9:605-616.
- Le Novère N, Zoli M, Changeux J (1996) Neuronal nicotinic receptor alpha 6 subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *Eur J Neurosci* 8:2428-2439.
- Le Novère N, Corringer PJ, Changeux JP (2002) The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 53:447-456.
- Lenoir M, Shnerson A, Pujol R (1980) Cochlear receptor development in the rat with emphasis on synaptogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 160:253-262.
- Levey MS, Brumwell CL, Dryer SE, Jacob MH (1995) Innervation and target tissue interactions differentially regulate acetylcholine receptor subunit mRNA levels in developing neurons *in situ*. *Neuron* 14:153-162.
- Lewis CA (1979) Ion-concentration dependence of the reversal potential and the single channel conductance of ion channels at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 286:417-445.
- Li W, Llopis J, Whitney M, Zlokarnik G, Tsien RY (1998) Cell-permeant caged InsP3 ester shows that  $Ca^{2+}$  spike frequency can optimize gene expression. *Nature*

392:936-941.

Liberman MC (1980) Efferent synapses in the inner hair cell area of the cat cochlea: An electron microscopic study of serial sections. *Hearing Research* 3:189-204.

Liberman MC, Dodds LW, Pierce S (1990) Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 301:443-460.

Liman ER, Tygat J, Hess P (1992) Subunit Stoichiometry of a Mammalian K<sup>+</sup> Channel Determined by Construction of Multimeric cDNAs. *Neuron* 9:861-871.

Lioudyno M, Hiel H, Kong JH, Katz E, Waldman E, Parameshwaran-Iyer S, Glowatzki E, Fuchs PA (2004) A "synaptoplasmic cistern" mediates rapid inhibition of cochlear hair cells. *J Neurosci* 24:11160-11164.

Lippe WR (1994) Rhythmic spontaneous activity in the developing avian auditory system. *J Neurosci* 14:1486-1495.

Liu QS, Berg DK (1999) Extracellular calcium regulates responses of both alpha3- and alpha7-containing nicotinic receptors on chick ciliary ganglion neurons. *J Neurophysiol* 82:1124-1132.

Llinas R, Steinberg IZ, Walton K (1981) Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J* 33:323-351.

Luetje CW, Patrick J (1991) Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 11:837-845.

Luo L, Bennett T, Jung HH, Ryan A (1998a) Developmental expression of alpha 9 acetylcholine receptor mRNA in the rat cochlea and vestibular inner ear. *J Comp Neurol* 393:320-331.

- Luo S, Kulak JM, Cartier GE, Jacobsen RB, Yoshikami D, Olivera BM, McIntosh JM (1998b) alpha-conotoxin AuIB selectively blocks alpha3 beta4 nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *J Neurosci* 18:8571-8579.
- Marcotti W, Kros CJ (1999) Developmental expression of the potassium current  $I_{K,n}$  contributes to maturation of mouse outer hair cells. *J Physiol* 520 Pt 3:653-660.
- Marcotti W, Johnson SL, Kros CJ (2004) A transiently expressed SK current sustains and modulates action potential activity in immature mouse inner hair cells. *J Physiol* 560:691-708.
- Marcotti W, Geleoc GS, Lennan GW, Kros CJ (1999) Transient expression of an inwardly rectifying potassium conductance in developing inner and outer hair cells along the mouse cochlea. *Pflugers Arch* 439:113-122.
- Marcotti W, Johnson SL, Rusch A, Kros CJ (2003a) Sodium and calcium currents shape action potentials in immature mouse inner hair cells. *J Physiol* 552:743-761.
- Marcotti W, Johnson SL, Holley MC, Kros CJ (2003b) Developmental changes in the expression of potassium currents of embryonic, neonatal and mature mouse inner hair cells. *J Physiol* 548:383-400.
- Maricq A, Peterson A, Brake A, Myers R, Julius D (1991) Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254:432-436.
- Mathie A, Cull-Candy SG, Colquhoun D (1987) Single-channel and whole-cell currents evoked by acetylcholine in dissociated sympathetic neurons of the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 232:239-248.
- Mayer ML, Westbrook GL (1987) Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid

- receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. *J Physiol* 394:501-527.
- McIntosh JM, Plazas PV, Watkins M, Gomez-Casati ME, Olivera BM, Elgoyhen AB (2005) A novel alpha-conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis*, discriminates between rat alpha9alpha10 and alpha7 nicotinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 280:30107-30112.
- McNiven AI, Yuhas WA, Fuchs PA (1996) Ionic dependence and agonist preference of an acetylcholine receptor in hair cells. *Auditory Neuroscience* 2:63-77.
- Miledi R, Parker I (1984) Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 357:173-183.
- Morley BJ, Li H, Hiel H, Drescher D, Elgoyhen AB (1998a) Identification of the subunits of the nicotinic cholinergic receptors in the rat cochlea using RT-PCR and in situ hybridization. *Molec Brain Res* 53:78-87.
- Morley BJ, Simmons DD (2002) Developmental mRNA expression of the alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit in the rat cochlea. *Brain Res Dev Brain Res* 139:87-96.
- Mulle C, Lena C, Changeux JP (1992a) Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron* 8:937-945.
- Mulle C, Choquet D, Korn H, Changeux JP (1992b) Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation. *Neuron* 8:135-143.
- Nenov AP, Norris C, Bobbin RP (1996a) Acetylcholine response in guinea pig outer hair cells. I. Properties of the response. *Hearing Research* 101:132-148.

- Nenov AP, Norris C, Bobbin RP (1996b) Acetylcholine responses in guinea pig outer hair cells. II Activation of a small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel. *Hearing Research* 101:149-172.
- Neuhaus R, Cachelin AB (1990) Changes in the conductance of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor channel induced by magnesium. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 241:78-84.
- Nguyen VT, Ndoye A, Grando SA (2000) Novel human alpha9 acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by *Pemphigus vulgaris* autoimmunity. *Am J Pathol* 157:1377-1391.
- Nicholson V, Tam, S, Myers M, Cook, L. (1990) Dup 996 (3,3-bis(pyrindinylmethyl)-1-phenyl-2-one) enhances the stimulus-induced release of acetylcholine from rat brain in vitro and in vivo. *Drug Dev Res* 19:285-300.
- Nieder P, Nieder I (1970) Antimasking effect of crossed olivocochlear bundle stimulation with loud clicks in guinea pig. *Exp Neurol* 28:179-188.
- Oatman LC (1976) Effects of visual attention on the intensity of auditory evoked potentials. *Exp Neurol* 51:41-53.
- Ohmori H (1985) Mechano-electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick. *J Physiol* 359:189-217.
- Oliver D, Knipper M, Derst C, Fakler B (2003) Resting potential and submembrane calcium concentration of inner hair cells in the isolated mouse cochlea are set by KCNQ-type potassium channels. *J Neurosci* 23:2141-2149.
- Oliver D, Klocker N, Schuck J, Baukowitz T, Ruppertsberg JP, Fakler B (2000) Gating of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron* 26:595-601.

- Oliver D, Ludwig J, Reisinger E, Zoellner W, Ruppertsberg JP, Fakler B (2001) Memantine Inhibits Efferent Cholinergic Transmission in the Cochlea by Blocking Nicotinic Acetylcholine Receptors of Outer Hair Cells. *Mol Pharmacol* 60:183-189.
- Park HJ, Niedzielski AS, Wenthold RJ (1997) Expression of the nicotinic acetylcholine receptor subunit,  $\alpha 9$ , in the guinea pig cochlea. *Hearing Research* 112:95-105.
- Patuzzi RB, Yates GK, Johnstone BM (1989) Outer hair cell receptor current and sensorineural hearing loss. *Hearing Research* 42:47-72.
- Peng H, Ferris RL, Matthews T, Hiel H, Lopez-Albaitero A, Lustig LR (2004) Characterization of the human nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 9 (CHRNA9) and alpha 10 (CHRNA10) in lymphocytes. *Life Sci* 76:263-280.
- Plazas PV, Katz E, Gomez-Casati ME, Bouzat C, Elgoyhen AB (2005) Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *J Neurosci* 25:10905-10912.
- Puel JL, Saffiedine S, Gervais d'Aldin C, Eybalin M, Pujol R (1995) Synaptic regeneration and functional recovery after excitotoxic injury in the guinea pig cochlea. *C R Acad Sci III* 318:67-75.
- Pujol R, Lavigne-Rebillard M, Lenoir M (1998) Development of Sensory and Neural Structures in the Mammalian Cochlea. *Development of the Auditory System (Rubel EW, Popper AN, Fay RR, eds) New York, Springer-Verlag pp 146-192.*
- Rajan R (1990) Functions of the efferent pathways to the mammalian cochlea. *Information Processing in Mammalian Auditory and Tactile Systems, Alan R. Liss, Inc, pp 81-96.*
- Ramirez-Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L (1996) Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels.



---

*Nature* 380:347-351.

Raymond V, Sattelle DB (2002) Novel animal-health drug targets from ligand-gated chloride channels. *Nat Rev Drug Discov* 1:427-436.

Ricci AJ, Fettiplace R (1998) Calcium permeation of the turtle hair cell mechanotransducer channel and its relation to the composition of endolymph. *J Physiol* 506:159-173.

Role LW, Berg DK (1996) Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 16:1077-1085.

Rothlin CV, Katz E, Verbitsky M, Elgoyhen AB (1999) The alpha9 Nicotinic Acetylcholine Receptor Shares Pharmacological Properties with Type A gamma-Aminobutyric Acid, Glycine, and Type 3 Serotonin Receptors. *Mol Pharmacol* 55:248-254.

Rothlin CV, Lioudyno MI, Silbering AF, Plazas PV, Casati ME, Katz E, Guth PS, Elgoyhen AB (2003) Direct interaction of serotonin type 3 receptor ligands with recombinant and native alpha 9 alpha 10-containing nicotinic cholinergic receptors. *Mol Pharmacol* 63:1067-1074.

Sands SB, Barish ME (1991) Calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels in PC12 cells. *Brain Res* 560:38-42.

Sanes D, Walsh E (1998) *Development of the Auditory System* (Rubel EW, Popper AN, Fay RR, eds) New York, Springer-Verlag pp 271-314

Schmieden V, Kuhse J, Betz H (1992) Agonist pharmacology of neonatal and adult glycine receptor  $\alpha$  subunits: identification of amino acid residues involved in taurine activation. *EMBO J* 11:2025-2032.

- Schuetze SM, Role LW (1987) Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* 10:403-457.
- Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain  $\alpha 7$ : a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13:596-604.
- Sgard F, Charpentier E, Bertrand S, Walker N, Caput D, Graham D, Bertrand D, Besnard F (2002) A novel human nicotinic receptor subunit,  $\alpha 10$ , that confers functionality to the  $\alpha 9$ -subunit. *Mol Pharmacol* 61:150-159.
- Sigel E, Baur R, Kellenberger S, Malherbe P (1992) Point mutations affecting antagonist affinity and agonist dependent gating of GABA<sub>A</sub> receptor channels. *EMBO J* 11:2017-2023.
- Simmons DD (2002) Development of the inner ear efferent system across vertebrate species. *J Neurobiol* 53:228-250.
- Simmons DD, Morley BJ (1998) Differential expression of the alpha 9 nicotinic acetylcholine receptor subunit in neonatal and adult cochlear hair cells. *Brain Res Mol Brain Res* 56:287-292.
- Simmons DD, Moulding HD, Zee D (1996a) Olivocochlear innervation of inner and outer hair cells during postnatal maturation: an immunocytochemical study. *Brain Res Dev Brain Res* 95:213-226.
- Simmons DD, Mansdorf NB, Kim JH (1996b) Olivocochlear innervation of inner and outer hair cells during postnatal maturation: evidence for a waiting period. *J Comp Neurol* 370:551-562.
- Simmons DD, Bertolotto C, Kim J, Raji-Kubba J, Mansdorf N (1998) Choline acetyltransferase expression during a putative developmental waiting period. *J*

*Comp Neurol* 397:281-295.

Sobkowicz HM, Slapnick SM (1994) The efferents interconnecting auditory inner hair cells. *Hearing Research* 75:81-92.

Soh H, Park CS (2001) Inwardly rectifying current-voltage relationship of small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels rendered by intracellular divalent cation blockade. *Biophys J* 80:2207-2215.

Taylor P (1990) Cholinergic agonists. *The pharmacological basis of therapeutics* (Goodman-Gilman A, Rall TH, Nies AS, Taylor P, eds), New York, Pergamon Press, pp 122-149.

Tsai MC, Su JL, Chen ML, Fan SZ, Cheng CY (1992) The effect of 3,3-dipyridylmethyl-1-phenyl-2-indolinone on the neuromuscular transmission in the rodent skeletal muscles. *Neuropharmacology* 31:89-94.

Turconi M, Donetti A, Schiavone A, Sagrada A, Montagna E, Nicola M, Cesana R, Rizzi C, Micheletti R (1991) Pharmacological properties of a novel class of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 203:203-211.

Unwin N (1993) Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol* 229:1101-1124.

Vanner S, Sruprenant A (1990) Effects of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists on 5-HT and nicotinic depolarizations in guinea-pig submucosal neurones. *Br J Pharmacol* 99:840-844.

Verbitsky M, Rothlin CV, Katz E, Elgoyhen AB (2000) Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology* 39:2515-2524.

- Vernino S, Rogers M, Radcliffe KA, Dani JA (1994) Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 14:5514-5524.
- Vernino S, Amador M, Luetje CW, Patrick J, Dani JA (1992) Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* 8:127-134.
- Vetter DE, Liberman MC, Mann J, Barhanin J, Boulter J, Brown MC, Saffiote-Kolman J, Heinemann SF, Elgoyhen AB (1999) Role of alpha9 nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron* 23:93-103.
- Vickroy TW (1993) Presynaptic cholinergic actions by the putative cognitive enhancing agent DuP 996. *J Pharmacol Exp Ther* 264:910-917.
- Villarroel A, Herlitz S, Koenen M, Sakmann B (1991) Location of a threonine residue in the alpha-subunit M2 transmembrane segment that determines the ion flow through the acetylcholine receptor channel. *Proc R Soc Lond (B)* 243:69-74.
- Walsh E, McGee J, McFadden S, Liberman M (1998) Long-term effects of sectioning the olivocochlear bundle in neonatal cats. *J Neurosci* 18:3859-3869.
- Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D (1998) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282:1890-1893.
- Weiss T (1982) Bidirectional transduction in vertebrate hair cells: a mechanism for coupling mechanical and electrical processes. *Hearing Research* 7:353-360.
- Weisstaub N, Vetter DE, Elgoyhen AB, Katz E (2002) The alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptor is permeable to and is modulated by divalent cations.

*Hearing Research* 167:122-135.

Wiederhold ML, Kiang NYS (1970) Effects of electrical stimulation of the crossed olivocochlear bundle on cat single auditory nerve fibres. *J Acoust Soc Amer* 48:950-965.

Yuhua WA, Fuchs PA (1999) Apamin-sensitive, small-conductance, calcium-activated potassium channels mediate cholinergic inhibition of chick auditory hair cells. *J Comp Physiol [A]* 185:455-462.

Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405:149-155.

Zheng XY, Henderson D, Hu BH, Ding DL, McFadden SL (1997) The influence of the cochlear efferent system on chronic acoustic trauma. *Hearing Research* 107:147-159.

Zoli M, Le Novère N, Hill JA, Jr., Changeux JP (1995) Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* 15:1912-1939.