BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

LABORATORIO "BIOMEDICINA. MED5. 217"

DETERMINACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LA PRESENCIA DE LA CORRIENTE GIRK EN NEURONAS AFERENTES VESTIBULARES

TESIS

Que para obtener el Grado de
Licenciado en Biomedicina

Presenta:
Francisco Juárez Mora

Matricula 201345909

Director de Tesis:

D. en C. Emmanuel Seseña Méndez

Puebla, Pue. Septiembre 2021.

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.

FACULTAD DE MEDICINA.

COORDINACIÓN DE EFICIENCIA TERMINAL EN PREGRADO

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

FORMATO "A" DE REGISTRO Y AUTORIZACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACION

No. de Folio de Registro: _____

DATOS DEL SOLICITANTE.

Utilizar los renglones para señalar los datos que se indican en relación con el solicitante:

Nombre Completo: _____FRANCISCO JUÁREZ MORA_____ Matricula:_____201345909_____

Correo Electrónico:_____juarez.mora@hotmail.com_____

No. Tel. Cel.: ___2224475565_____ No. Alterno:____(222) 6403717___ Firma: _____

NOMBRE DEL TEMA:

Determinación electrofisiológica de la presencia de la corriente GIRK en neuronas aferentes vestibulares.

JUSTIFICACIÓN:

La actividad eléctrica de las neuronas aferentes vestibulares es modulada por diversos receptores acoplados a proteínas G, teniendo en cuenta que las subunidades de las proteínas G pueden modular canales de potasio y teniendo en cuenta las características de descarga de las neuronas aferentes vestibulares es factible que estas neuronas expresen funcionalmente canales de potasio tipo GIRK. Los abordajes electrofisiológicos nos permitirán evidenciar la presencia de los canales GIRK en las neuronas aferentes vestibulares, así como su posible modulación por receptores acoplados a proteínas G del tipo MOR y ORL-1.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar mediante registros electrofisiológicos si las neuronas aferentes vestibulares en cultivo expresan la corriente GIRK, y en dado caso si dicha corriente es modulada por opioides.

TIPO DE ESTUDIO:

Investigación Básica.

INSTITUCIÓN EN LA QUE SE REALIZARÁ EL ESTUDIO:

Facultad De Medicina e Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma De Puebla.

DIRECTOR:

Nombre: _____D.C Emmanuel Seseña Méndez_____ No. De trabajador: _____100494400_____

Especialidad: _____Neurosciencia_____ Correo Electrónico: ____emmanuel_ssmd@hotmail.com_____

Teléfono: __2221219007_____ Firma de aceptación: _____

CO-DIRECTOR

Nombre: _____N/A_____No. De trabajador:_____N/A_____

Especialidad: _____N/A_____Correo Electrónico: _____N/A_____

Teléfono: _____N/A_____ Firma de aceptación: _____

FIRMA Y FECHA DE AUTORIZACIÓN_____

COORDINADORA DE TITULACION Y EFICIENCIA TERMINAL
MASS. IRMA ORTEGA SANCHEZ

BUAP

Oficio No SIEP / C.I. / 054 /2020

Asunto: Constancia de Registro

D.C. EMMANUEL SESEÑA MÉNDEZ.
FRANCISCO JUÁREZ MORA.

P R E S E N T E S:

El Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la B.U.A.P., a través de la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado hace **C O N S T A R** que el Proyecto de Investigación presentado en autoría Colectiva por:

- **FRANCISCO JUÁREZ MORA.**
- **D.C. EMMANUEL SESEÑA MÉNDEZ.**

Titulado:

"DETERMINACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LA PRESENCIA DE LA CORRIENTE GIRK EN NUERONAS AFERENTES VESTIBULARES"

Ha sido registrado en esta Secretaría con los siguientes datos:

Fecha de registro: 24 de febrero de 2020.
Número de Libro: 2
Número de Hoja: 130
Número de Registro: 805
Vigencia: **Inicio 24 de febrero** **Termino 31 de diciembre de 2020**

A T E N T A M E N T E
"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"
H. PUEBLA DE Z., A 24 DE FABRERO DE 2020.

BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA · FACULTAD DE MEDICINA · COMITÉ DE INVESTIGACIÓN · 1578

M.C. JOSE LUIS GANDARA RAMIREZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

D.C. JORGE ALEJANDRO CEBADA RUIZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN
c.c.p. archivo
c.c.p. minutario
DC´ETR*etr

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.
FACULTAD DE MEDICINA.
COORDINACIÓN DE EFICIENCIA TERMINAL EN PREGRADO

FORMATO "C" DE AUTORIZACIÓN DE TESIS.
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

DATOS DEL SOLICITANTE.

Nombre Completo: Francisco Juárez Mora
Matricula: 201345909

Correo Electrónico: juarez.mora@hotmail.com , Teléfono 2224475565

Fecha de Ingreso y Egreso: otoño 2013 - primavera 2019 Firma:

Folio otorgado por el Comité de Investigación De Posgrado: Oficio No. IF-LB/048/2021

TÍTULO DE LA TESIS:

DETERMINACION ELECTROFISIOLÓGICA DE LA PRESENCIA DE LA CORRIENTE GIRK EN NEURONAS AFERENTES VESTIBULARES.

ÁREA DEL ESTUDIO: Investigación básica Biomedicina.

Presentarla la tesis elaborada en computadora, con letra Arial, numero 12 a espacio y medio firmada por los asesores de la Tesis y coordinación de titulación

DIRECTOR: D.C. Emmanuel Seseña Méndez ID BAUP: 100494400

Firma de autorización:

CODIRECTOR: N/A ID BUAP: _____

Firma de autorización: _____

El trabajo de escrita de la tesis y su revisión por parte del comité revisor correspondiente ha concluido y queda de manifiesto por medio del oficio No.: IF-LB/049/2021, el cual ha sido emitido por el responsable del eje terminal de la licenciatura en Biomedicina.

Visto bueno y se autoriza la impresión de la Tesis.

MASS IRMA ORTEGA SANCHEZ
COORDINADORA DE TITULACION Y E/T **FIRMA**
SELLO DE AUTORIZACIÓN

"Somos en realidad, lo que nuestras sinapsis dictan"

(Ricardo Miledi)

AGRADECIMIENTOS

Gracias a los doctores que me abrieron las puertas de su laboratorio de Neurofisiología Sensorial, por depositar un voto de confianza en mi formación profesional y brindarme de sus conocimientos.

D. en C. María del Rosario Guadalupe Vega y Sáenz de Miera y D. en C. Enrique Soto Eguibar.

Agradezco a la persona quien me ha instruido en el inicio por el camino de la investigación, por transmitirme su pasión y dedicación a la ciencia. Por depositar un voto de confianza en mí y enseñarme que el conocimiento se obtiene del tiempo y del esfuerzo. Sobre todo, por la infinita paciencia que me tuvo en la realización de este trabajo, muchas gracias.

D. en C. Emmanuel Seseña Méndez

Agradezco a mis revisores de este trabajo, por aportar de su conocimiento y tiempo, por todas sus correcciones y por su interés en que lograra una meta más.

D. en C. Roberto Berra Romani y D. en C. Enrique Soto Eguibar

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) que me permitió acceder al Programa AYUDANTES DE INVESTIGADOR NACIONAL NIVEL III O EMÉRITO, y al D. en C. Enrique Soto quien me asigno la beca, muchas gracias
Con el núm. de proyecto EXP. AYTE-16125

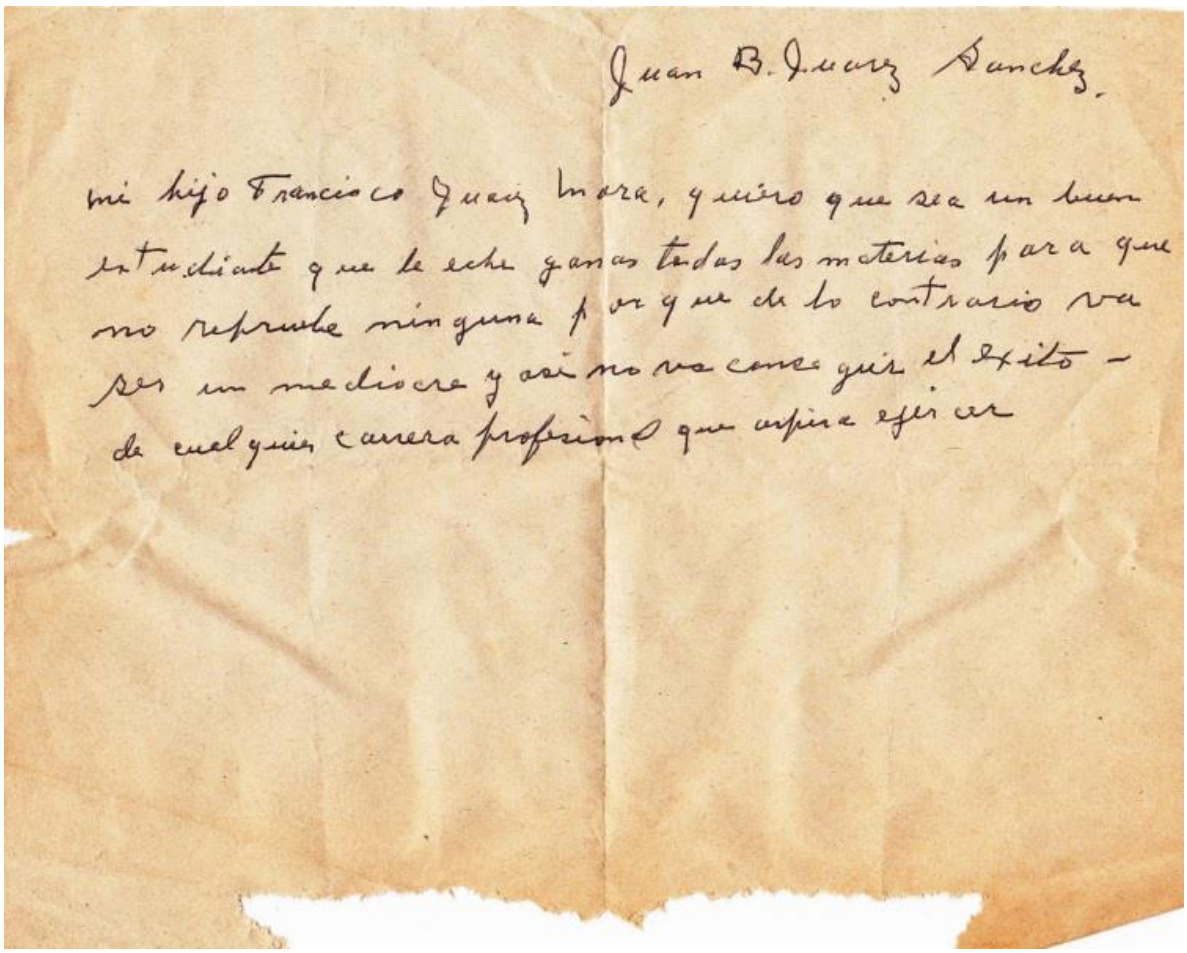
A la D. en C. Amira del Rayo Flores Urbina por su valioso apoyo en los trámites administrativos, que no fueron nada fáciles. Le estoy infinitamente agradecido.

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre

Juan Buenaventura Juárez Sánchez

Te recuerdo con mucho cariño.


Juan B. Juarez Sanchez.

mi hijo Francisco Juarez Mora, quiero que sea un buen estudiante que le eche ganas todas las materias para que no reprueba ninguna por que de lo contrario va ser un mediocre y así no va conseguir el éxito - de cualquier carrera profesional que aspira ejercer

Para mi familia.

A mi madre Celia Hermelinda Mora Roque quien dedico un esfuerzo incondicional para mi educación y superación, por tus palabras muchas gracias.

Té amo.

A mis hermanos Juan y Miguel Ángel por ser un ejemplo de fuerza y resistencia, los quiero.

A mis amigos.

Por su paciencia y dedicación para hacer los experimentos juntos en el laboratorio y no sucumbir ante el fracaso. Y por hacer de este tiempo momentos únicos.
Gracias Katya Mariana Rosas Rodríguez.

A mis amigos de la carrera que sin duda fueron clave para lograr este éxito, esto es para ti, Jesua Bueno, Selene Cruz, José Luis Ramos, Jorge Ventura, Brenda Soria, Bryan Perea, Jorge Ojeda, Audrey Ortega y todos mis demás amigos que de alguna manera formaron parte de este logro.

Contenido

RESUMEN 1
ANTECEDENTES GENERALES 3
1. Sistema vestibular 3
1.1. Neuronas aferentes vestibulares 7
1.2. Integración central de la información vestibular 9
1.3. Vías eferentes vestibulares 11
ANTECEDENTES ESPECIFICOS 12
2. Efectos de alcohol en el SNC y el sistema vestibular 12
3. Opioides como moduladores de la corriente GIRK 13
4. Excitabilidad neuronal y canales de potasio en las NAV 14
5. Canales GIRK estructura y función 17
5.1. Moduladores de los canales GIRK 19
5.2. Alcoholes como moduladores de la corriente GIRK 21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 23
HIPÓTESIS 24
JUSTIFICACIÓN 24
OBJETIVOS 25
Objetivo General 25
Objetivos particulares 25
MATERIAL Y MÉTODOS 26
1. NORMAS BIOÉTICAS 26
2. CULTIVOS NEURONALES 26
3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS 28
3.1 Set de registro 28
3.2 Soluciones de registro 29
3.3 Fármacos 30
3.4 Protocolos de estimulación 31
4. ANÁLISIS 35
4.1. Análisis de los registros en *Voltage Clamp* 35

4.2. Análisis de los registros en C*urrent Clamp* 36

4.3. Análisis estadístico 37

RESULTADOS 38

1. PROPIEDADES PASIVAS DE LAS NAV 38

2. EVIDENCIA DE LA CORRIENTE GIRK EN CURRENT CLAMP 39

2.1 Evidencia de la presencia de la corriente GIRK mediante la evaluación de la descarga dinámica de PA (NAVs de ratas de 7 a 10 días) 39

2.2 Evidencia de la presencia de la corriente GIRK mediante la evaluación de la descarga dinámica de PA (NAVs de ratas de 28 a 30 días) 41

2.3. Evidenciar la presencia de la corriente GIRK mediante la medición del Vm ante pulso hiperpolarizante (NAVs de ratas de 7 a 10 días) 43

2.4. Evidenciar la presencia de la corriente GIRK mediante la medición del Vm ante pulso hiperpolarizante (NAVs de ratas de 28 a 30 días) 45

2.5. Análisis de las propiedades del PA ante la aplicación de DAMGO y Etanol en NAVs de ratas de P7-P10 dias 46

2.6. Análisis de las propiedades del PA con aplicación de DAMGO y Etanol en NAVs en ratas de 28-30 días 47

3. EVIDENCIA DE LA CORRIENTE GIRK EN *VOLTAGE CLAMP* 48

3.1. Evidencia de la corriente GIRK con alto K^+ 48

3.2. Evidencia de la corriente GIRK por alcoholes Butanol e Isopropanol 49

3.3 ML297 3µM 52

DISCUSIÓN 54

CONCLUSIÓN 55

REFERENCIAS 56

RESUMEN.

El vértigo, el mareo y el desequilibrio son los principales síntomas de los trastornos vestibulares. En niños con problemas de fijación de la mirada asociado con disfunción vestibular pueden llevar a problemas de lectura y repercutir sobre su desarrollo cognitivo. El sistema vestibular decodifica información durante nuestras actividades diarias utilizando vías neurales específicas permitiendo establecer esquemas de la posición y la dinámica de los desplazamientos del organismo. Las neuronas aferentes vestibulares (NAV) son la principal vía de estrada del sistema vestibular y tienen alta regulación por muchas sustancias neuroactivas entre ellas se encuentran los péptidos opioides dadas por las terminaciones eferentes y propias de las sinapsis con las células ciliadas.

Las NAV son moduladas por diversos receptores acoplados a proteínas G y las subunidades de las proteínas G pueden modular canales de potasio de acuerdo teniendo en cuenta las características de descarga de las neuronas aferentes vestibulares, es factible que estas neuronas expresen funcionalmente canales de potasio tipo GIRK. Por lo tanto, el canal GIRK es potencialmente una de los blancos moleculares clave para promover una mejor comprensión de la dinámica de descarga de las NAV. Todo esto nos lleva a cuestionarnos sí ¿Las neuronas aferentes vestibulares expresan funcionalmente a la corriente GIRK y cuál es su importancia sobre la dinámica de los potenciales de acción?.

Para evidenciar la presencia de esta corriente se hicieron cultivos primarios de las neuronas aferentes vestibulares y dado que el sistema vestibular en las ratas no se encuentra completamente maduro hasta la cuarta semana postnatal a nivel funcional, decidimos hacer registros en NAV de ratas postnatales de 7-10 días (P7-P10) y 28-30 días (P28- P30). A las 24hrs en cultivo se hicieron registros electrofisiológicos de fijación de voltaje (Voltage Clamp) y fijación de corriente (Current Clamp) en la configuración de célula completa ante la aplicación de agonistas GIRK como etanol, butanol, isopropanol, DAMGO, N/OFQ y un agonista especifico de la subunidad GIRK1, (ML297).

Encontramos que en NAV (P7-P10). La aplicación de solución extracelular con alto K^+ [20 mM] y [40 mM] evidenció un aumento en la corriente rectificante entrante de K^+, donde participan los canales HCN y probablemente los canales GIRK. La aplicación de DAMGO [3 µM] y Et-OH [30 mM] aumentaron la tasa máxima de despolarización del PA y la aplicación de Isopropanol [1 M] modifico significativamente la amplitud de la corriente de potasio activada por voltaje hiperpolarizante. En NAV (P28-P30) la aplicación DAMGO [3 µM] y Et-OH [30 mM] aumentó significativamente la descarga dinámica de PA a un 216. 3 ± 2 % y 118.5 ± 119 % respectivamente y DAMGO [3 µM] modifico la tasa máxima de despolarización del PA.

Falta evidencia contundente que nos defina la presencia de la corriente GIRK en las NAV, Las neuronas aferentes vestibulares no aumentaron la corriente entrante ante el pulso hiperpolarizante con el agonista ML297 que es selectivo para los canales que presentan la subunidad GIRK1, por lo que concluimos que no está presente la subunidad GIRK1 en las NAV.

Palabras clave: Sistema vestibular, Neuronas aferentes vestibulares, Receptor opioide Mu (MOR), Canales GIRK, Agonista GIRK, ML297.

ANTECEDENTES GENERALES

1. Sistema vestibular

Comprender como el cerebro calcula las estimaciones precisas de nuestro movimiento con el ambiente que nos rodea y nuestra orientación en relación con la gravedad para asegurar una percepción precisa, sigue siendo una de las más grandes preguntas en neurociencia, recientes experimentos han revelado que el sistema vestibular decodifica esta información durante nuestras actividades diarias utilizando vías neurales específicas. Además, nuevos hallazgos han establecido que las señales vestibulares se combinan selectivamente con información extravestibular en los estadios tempranos del procesamiento vestibular central. Entender como las vías sensoriales transmiten información sobre condiciones naturales permanece como una de las mayores metas en neurociencia pues filogenéticamente el sistema vestibular es la parte más antigua del oído interno (Cullen, 2019).

Las entradas vestibulares no son nuestra única fuente de información sobre el movimiento propio, a medida que un organismo interactúa con su entorno las entradas somatosensoriales, propioceptivas y visuales, así como las señales motoras relacionadas, también proporcionan señales de auto-movimiento. El sistema vestibular es una organización sensorial compleja que involucra la comunicación entre el aparato vestibular periférico, el sistema ocular, los músculos de la postura, el tronco encefálico, el cerebelo y la corteza cerebral. Formando un sistema de integración multimodal que coordina la información recibida de varios sistemas sensoriales. Esta información es integrada a nivel central permitiendo establecer esquemas de la posición y la dinámica de los desplazamientos del organismo y generar reflejos que son vitales para la estabilización de la mirada y el mantenimiento de la postura durante nuestras actividades diarias (Khan y Chang, 2013; Cullen, 2011; Flores, Galicia y Gómez, 2001).

El vestíbulo está localizado en el oído interno y tiene como función determinar la posición de la cabeza en el espacio y detectar los movimientos a los cuales ésta es sometida. Desde los puntos de vista funcional y anatómico, el sistema vestibular se conforma por tres niveles de organización: un sistema vestibular periférico, un procesador de información integrado por los núcleos vestibulares a nivel central y un componente eferente para el control motor (Cortes, 2013).

El sistema vestibular periférico se establece en la capsula ótica en la porción petrosa del hueso temporal, consiste de un laberinto óseo con estructuras conformadas por una cavidad oval llamada el vestíbulo conjunto con los canales semicirculares que están llenos con un fluido continuo con una composición similar al fluido cerebroespinal, conocido como perilinfa. También tiene un laberinto membranoso que alberga el epitelio sensorial y estructuras del aparato vestibular y están suspendidas en la perilinfa dentro del laberinto óseo. La endolinfa fluye a través de las estructuras del laberinto membranoso y es similar en composición al líquido intracelular, este fluido es producido por los capilares de la stria vascularis en la pared del ducto coclear y es absorbido por el saco endolinfático (Khan y cols. 2013) (Figura 1.1).

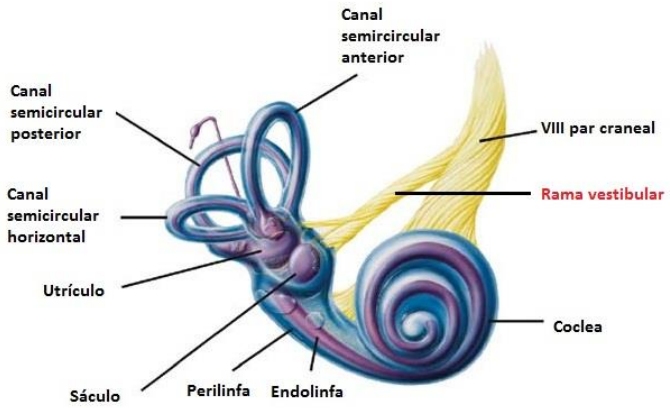


Figura 1.1. Organización morfológica del oído interno. *Diferentes estructuras sensoriales del oído interno, se observan los cinco órganos sensoriales del aparato vestibular, los tres canales semicirculares y los órganos otolíticos (utrículo y sáculo) (Modificado de Marcotti y Masetto, 2010).*

El aparato vestibular está compuesto de 5 órganos sensoriales: los tres canales semicirculares aproximadamente ortogonales que detectan los movimientos rotacionales y angulares de la cabeza, y dos órganos otolíticos (el utrículo y el sáculo) que detectan las aceleraciones lineales. Los canales semicirculares desembocan en el vestíbulo por sus dos extremos, de los que uno, denominado la ampolla, tiene doble diámetro que el otro y es donde residen los receptores de movimiento angular, las crestas ampulares. Estas crestas tienen forma de silla de montar, situándose en las dos vertientes de dicha silla, sustentadas por las células de sostén y cubiertas por una sustancia gelatinosa rica en mucopolisacáridos, llamada cúpula, que cierra herméticamente el espacio entre la cresta y el techo de la ampolla (Vidal, Cullen, Curthoys, Du Lac, Holstein y cols., 2015; García, Aviñoa, y Arjona, 2001).

El utrículo y sáculo también contienen un neuroepitelio sensorial denominado macula, la macula del utrículo detecta movimiento en el plano horizontal, mientras la macula del sáculo detecta movimiento en el plano vertical. El interior de la maculas están cubiertas con una membrana gelatinosa embebidas con pequeñas partículas de carbonato de calcio denominados otolitos u otoconias, consisten en una disposición compleja de sustancia mineral y orgánica, que se encuentra sobre las células neurosensoriales (García y cols., 2001. Khan y cols., 2013. Jamon. 2014) (Figura 1.2).

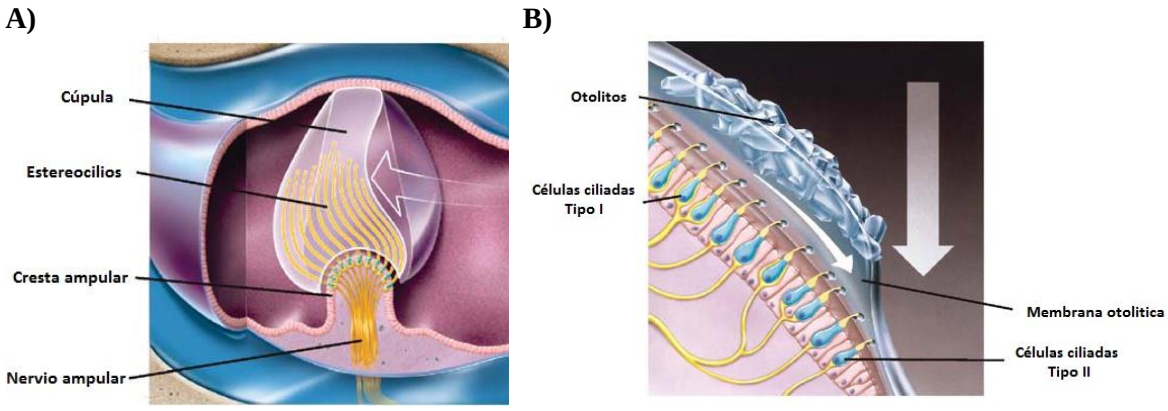


Figura 1.2. Neuroepitelios sensoriales y estructuras accesorias presentes en los canales semicirculares (A) y órganos otolíticos (B). *Las células ciliadas tipo I y tipo II son encontradas en las crestas ampulares y las maculas. En los canales semicirculares, los estereocilios están embebidos en un material gelatinoso denominado la cúpula (A). El movimiento de la cúpula, como una consecuencia de la rotación de la cabeza (flecha en blanco), resulta en una deflecion de los estereocilios. En el sáculo y el utrículo las puntas de los estereocilios están incrustados en la membrana otolitica (B). Se observa la presencia de pequeñas partículas de carbonato de calcio denominados otolitos embebidos en la membrana gelatinosa. El Movimiento otolítico producido por aceleraciones verticales u horizontales de la cabeza (flecha en blanco) desplazan la membrana del otolitica, el cual flexiona los estereocilios (Modificado de Marcotti y Masetto, 2010).*

Los neuroepitelios sensoriales, las maculas y las crestas ampulares, ambas estructuras contienen mecanorreceptores sensoriales denominadas células ciliadas encargadas del proceso de mecanotransducción, es decir, tiene la capacidad de sensar los movimientos que ejercen las estructuras en el espacio y hacer la conversión de la energía mecánica de un desplazamiento lineal o angular en cambios eléctricos dentro de la célula. Para realizar todos estos procesos de transducción de energía las células ciliadas se ayudan por las células de soporte mismas que las rodean y las mantienen fijas.

Por tanto, las células ciliadas presentes en la periferia vestibular tienen como función convertir la energía correspondiente a la aceleración lineal o angular de la cabeza en eventos eléctricos de magnitud graduada es decir tienen la capacidad de generar un potencial receptor y transmitirlo por vía sináptica a neuronas aferentes primarias ocasionando su despolarización. (Cortes, 2013; Flores y cols. 2001). Las neuronas aferentes vestibulares hacen sinapsis por un lado en la periférica con las células ciliadas y por otro a nivel central con neuronas de los núcleos vestibulares en el tallo cerebral y con neuronas del cerebelo. Una descripción breve de la entrada vestibular incluye la generación de la señal de movimiento inicial mediante la activación de las células ciliadas en los canales semicirculares y / u órganos otolíticos en el oído interno, y llega al cerebro a través de las aferentes sensoriales primarias.

En cuanto a la actividad eléctrica de las neuronas aferentes vestibulares, tienen una dinámica compleja que varía en función de las aceleraciones tanto lineales como angulares, llevando información acerca de los movimientos y de la posición de la cabeza a las áreas del sistema nervioso central involucradas en el control de la postura y del movimiento de los ojos mismos que ayudan a mantener muchas de las condiciones por las cuales el organismo se puede desplazar con tanta facilidad (Soto y cols. 2002; Mathews, Camp y Murray, 2017).

Los axones de las neuronas aferentes vestibulares forman el nervio vestibular. Este se combina con el nervio coclear para conformar el nervio vestibulococlear (VIII par craneal) atraviesan la porción petrosa del hueso temporal hasta entrar en el tronco encefálico en la unión pontomedular. En este punto el nervio vestibular se separa del nervio coclear y la mayoría de las fibras aferentes vestibulares proyectan ipsilateralmente al núcleo vestibular. Algunas de las fibras proyectan directamente al lóbulo floculo-nodular cerebelo a través del pedúnculo cerebeloso inferior donde se coordinan los movimientos que mantienen el equilibrio. Y hay otras fibras que proyectan hacia la corteza vermiana adyacente (Khan y cols., 2013).

1.1. Neuronas aferentes vestibulares

Las neuronas aferentes vestibulares de primer orden han sido descritas en mamíferos, en aves y en vertebrados inferiores. Estas neuronas tienen sus cuerpos celulares localizados en la porción lateral de meato auditivo interno, en el ganglio vestibular (Scarpa), el cual está compuesto por cerca de 20,000 neuronas bipolares que reciben impulsos aferentes de las células ciliadas de las crestas ampulares y las maculas.

El ganglio vestibular tiene una división superior y una inferior cuyas fibras periféricas de la división superior terminan en la cresta ampular de los canales semicirculares anterior y horizontal, así como también, de la macula del utrículo, en la división superior también hay un pequeño componente llamado nervio de Voit´s que emerge de la región anterior de la macula del sáculo. Mientras la división inferior recibe ramas periféricas del canal semicircular posterior y la macula del sáculo (Vidal y cols., 2015; Khan y cols., 2013) (Figura 1.3).

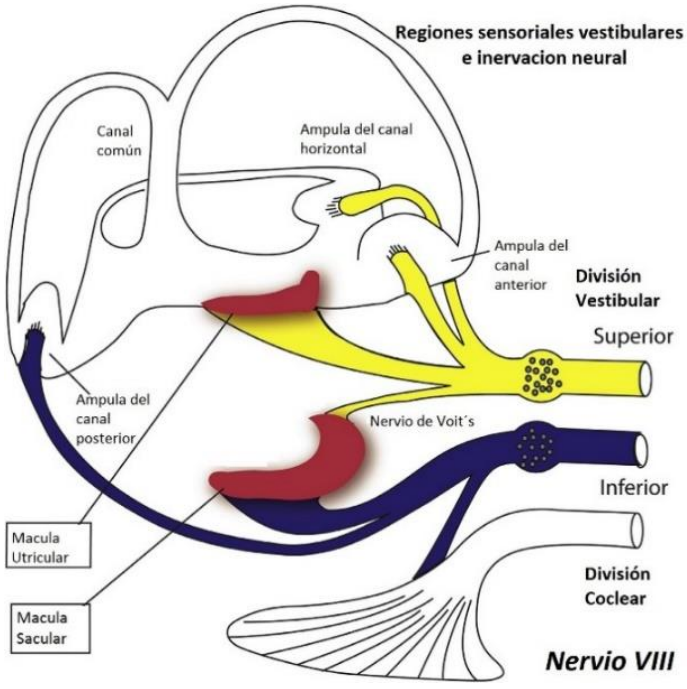


Figura 1.3. División superior e inferior del ganglio vestibular. *Se muestra como las aferentes vestibulares integran información periférica de varios órganos sensoriales vestibulares (Modificado de Vidal y cols., 2015).*

Existe una heterogeneidad entre la actividad espontánea en reposo de las fibras aferentes vestibulares. Unas fibras prácticamente no tienen descarga y otras tienen una frecuencia de disparo de más de 100 espigas/s (Fettiplace, 2017). Las aferentes vestibulares han sido clasificadas en regulares e irregulares con base en sus propiedades descarga espontanea, excitabilidad y respuesta ante estímulos eléctricos, estas diferencias han sido atribuidas a las características de la entrada sináptica y de sus propiedades intrínsecas. (Soto y cols. 2002; Flores y cols. 2001).

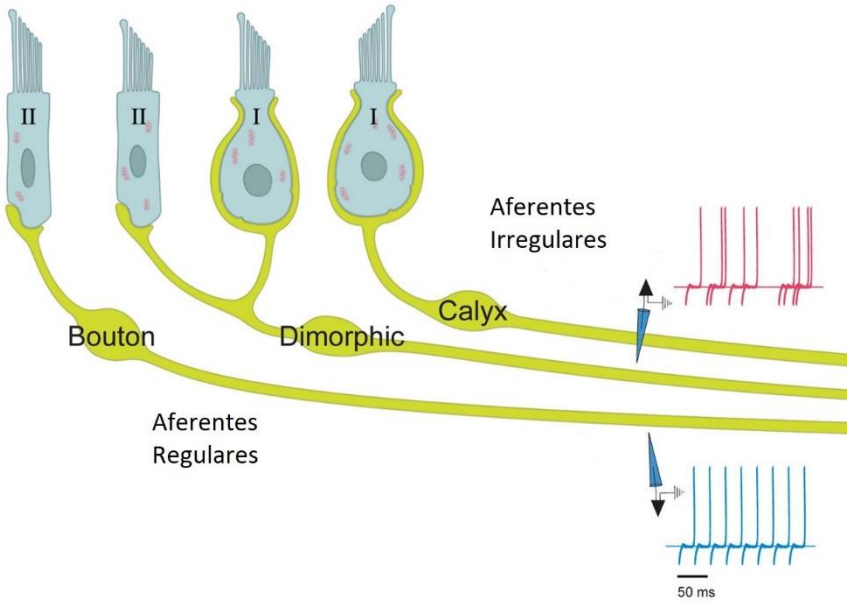


Figura 1.4. Clasificación electrofisiológica de las NAV. *Representación de una terminal aferente regular en forma de botón en contacto con una célula ciliada tipo II. Una terminal aferente irregular en forma de cáliz alrededor de una célula ciliada tipo I. Además, una aferente irregular que contacta ambos tipos de células ciliadas también denominada D-irregular. Se muestra la diferencia en la variabilidad de descarga en reposo de las aferentes regulares (azules) e irregulares (rojas) (Modificado de: Cullen, 2011).*

Las aferentes vestibulares de primer orden han sido clasificadas en regulares (tónicas) e irregulares (fásicas) con base en sus propiedades descarga espontanea, excitabilidad y respuesta ante estímulos eléctricos, estas diferencias han sido atribuidas a las características de la entrada sináptica y de sus propiedades intrínsecas (Soto y cols., 2002. Flores y cols., 2001).

Las neuronas tónicas responden a desplazamientos mecánicos de las ámpulas y las máculas y es por ello que codifican la velocidad angular de la cabeza en los canales y la aceleración gravito-inercial de la cabeza en los otolitos mientras las fásicas son sensibles a desplazamiento mecánico y también a la velocidad del desplazamiento. Por eso codifican para cambios en las velocidades de la cabeza y en la aceleración linear (Vidal y cols., 2015). Las neuronas *regulares* de primer orden comprenden unidades dimórficas y de botón en la zona extraextriolar de las máculas otolíticas y periférica de las crestas ampulares, se caracterizan por tamaño mediano, axones de conducción lenta y por una baja sensibilidad a la rotación de la cabeza y a la estimulación galvánica.

Las neuronas vestibulares *irregulares* de primer orden incluyen unidades en forma de cáliz y dimórficas que inervan las zonas centrales de las crestas ampulares y las máculas otolíticas. Se caracterizan por mediano y gran tamaño, axones de conducción rápida y por respuestas excitadoras a la estimulación eferente. Su sensibilidad a la aceleración lineal o angular de la cabeza y estimulación eléctrica es en promedio seis veces más alta que la aferentes regulares (Vidal y cols., 2015).

1.2. Integración central de la información vestibular

El complejo vestibular nuclear es el procesador primario de la entrada vestibular y consiste en 4 núcleos principales: núcleo vestibular medial (NVM), núcleo vestibular superior (NVS), núcleo vestibular lateral (NVL) y núcleo vestibular inferior/descendente (NVD). Estos núcleos también son conocidos como: Schwalbe, Bechterew, Deiter y Descendente respectivamente. Están localizados debajo del suelo del cuarto ventrículo y se extienden desde la médula rostral a la protuberancia caudal en dos columnas principales. El núcleo vestibular medial es el más grande y compone la columna medial. La columna lateral consiste en los núcleos vestibulares superior, lateral e inferior. Estos núcleos vestibulares a su vez envían prolongaciones hacia centros que regulan la postura, el equilibrio y los movimientos oculares (Khan y cols., 2013).

El *núcleo vestibular medial* recibe aferentes de la crista ampullaris del conducto semicircular lateral. Envía fibras eferentes ascendentes que viajan a través del fascículo longitudinal medial a los núcleos motores de los músculos extraoculares (III, IV, VI, controlando los movimientos oculares), para mediar el reflejo vestibuloocular. Este también contribuye en el control del reflejo vestibuloespinal a través de proyecciones descendentes bilaterales en el tracto vestibuloespinal medial hacia la médula espinal cervical para permitir la coordinación del movimiento de la cabeza y cuello. El *núcleo vestibular superior* recibe entrada vestibular aferente de la crista ampullaris de los conductos semicirculares superior y posterior como del nucleó vestibular medial. Este envía fibras ascendentes eferentes hacia los músculos extraoculares por la via del fascículo longitudinal medial en orden para coordinar el reflejo vestibuloocular (Khan y cols. 2013).

El *núcleo vestibular lateral* contiene las células más grandes de todos los núcleos vestibulares. Recibe entrada aferente de la ampolla, las máculas y el vestibulocerebelo. Las proyecciones eferentes de este núcleo se convierten en el tracto vestibular lateral en la médula espinal ipsilateral. Este tracto funciona en el relejo vestibuloespinal coordinando tono reflexivo en el tronco y los músculos extensores proximales de las extremidades para mantener la postura y equilibrio. Y el *núcleo vestibular inferior* recibe información aferente de las maculas tanto del utrículo como del sáculo, este núcleo tiene proyecciones que van a los tres núcleos vestibulares y cerebelo (Khan y cols. 2013).

El papel del cerebelo en el sistema vestibular funciona como un procesador adaptativo, monitorea el rendimiento vestibular y se reajustar a la entrada vestibular a través de entrada inhibitoria según sea necesario. El cerebelo puede enviar información eferente a núcleos bilaterales vestibulares. El flócculo cerebeloso ajusta la ganancia del reflejo vestibuloocular y el vermis superior anterior juega un papel en la regulación del reflejo vestibuloespinal mediante codificación de señales vestibulares y aporte propioceptivo de los músculos axiales. Registros específicos de las conexiones corticales vestibulares no se entienden claramente y con respecto a la ubicación de una corteza vestibular todavía aún no se ha definido. En humanos sugieren que la región principal del procesamiento está muy probablemente en el área denominada “corteza vestibular temporo-peri-sylvian” y sugieren que corresponde a la corteza parientoinsular vestibular (PIVC) en primates (Khan y cols. 2013).

1.3. Vías eferentes vestibulares

Los circuitos eferentes dentro del sistema nervioso llevan los impulsos nerviosos del sistema nervioso central (SNC) hacia los órganos sensoriales terminales. La eferencia vestibular se origina en el tronco encefálico y se proyectan hacia la periferia, formando sinapsis con las células ciliadas y las fibras aferentes primarias de los canales semicirculares y órganos otolíticos dentro del oído interno. Sin embargo, la función del sistema vestibular eferente (SVE) en la coordinación vestibular y motora ha sido difícil de determinar. Los estímulos sensoriales activan los receptores periféricos y, a su vez, las neuronas sensoriales aferentes que codifica la información utilizada por el SNC para modular la salida motora. Esta descripción lineal de la función del sistema nervioso se complica por el reclutamiento central de vías eferentes, que inervan los sensores periféricos y modulan su actividad, es decir, el SVE proporcionan al sistema nervioso la capacidad de ajustar su propia visión del entorno externo. (Mathews y cols. 2017).

La posición de las neuronas vestibulares eferentes dentro de sus núcleos cerebrales se conserva notablemente en todas las especies de mamíferos y no mamíferos. En vertebrados no mamíferos, las neuronas eferentes se limitan a un solo grupo y en mamíferos puede poseer múltiples grupos, dependiendo de la especie como en el ratón y el gato que solo tienen un grupo de neuronas en el núcleo vestibular eferente (NVE) y en otros mamíferos, se observó más de un grupo con el núcleo principal denominado grupo e. En la mayoría de peces y mamíferos demuestran aumentos en la descarga aferente de fondo en respuesta a la estimulación de la vía eferente. Estos efectos son particularmente pronunciados en las aferentes primarias que disparan irregularmente y pueden resultar en una reducción concomitante de la sensibilidad o ganancia de la entrada vestibular (Mathews y cols. 2017; Goldberg y Fernández, 1980).

Las neuronas NVE son generalmente aceptadas como colinérgicas, pero también expresan péptidos relacionados con el gen de la calcitonina (CGRP), adenosina 5′-trifosfato (ATP) que se libera junto con acetilcolina (ACh), noradrenalina (NA), dopamina (DA) y GABA. El óxido nítrico se ha localizado en las neuronas NVE, así como en sus terminales dentro de los órganos finales y los receptores opioides también han sido implicados en la entrada excitadora post-sináptica a las aferentes vestibulares y en la entrada presináptica inhibitoria

a las células ciliadas Todo esto destaca la complejidad de las interacciones vestibulares central-periféricas y la diversidad en el rendimiento funcional del SVE. (Mathews y cols. 2017; Vega y Soto, 2003).

ANTECEDENTES ESPECIFICOS

2. Efectos de alcohol en el SNC y el sistema vestibular

El mareo es el principal síntoma de un trastorno del equilibrio que puede originarse en el sistema vestibular, muchas drogas pueden causar efectos nocivos para el ser humano, como tinnitus y vértigo, entre los muchos agentes ototóxicos el alcohol está presente. El alcohol se encuentra como una droga exógena cuya exposición puede causar la pérdida total o parcial de las funciones vestibulares que interfieren en el equilibrio (Bellé, Amaral y García, 2007). El alcohol ejerce su principal influencia sobre el sistema nervioso, la acción del alcohol es fundamentalmente depresiva, por la reducción de la transmisión sináptica en el sistema nervioso humano. El alcohol se difunde fácilmente a través de las membranas biológicas, lo cual permite una amplia y fácil dispersión en el cuerpo. El alcohol es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica en un 90%, de ahí que se le atribuye un efecto directo, logrando incluso interferir en los potenciales de acción (Arias, 2005).

La ingestión en exceso de la cantidad de alcohol puede resultar en pérdida de coordinación y equilibrio, torpeza, ataxia, mareos, dificultad para hablar, déficits cognitivos, y tal vez, náuseas. Ha sido mostrado que el cerebelo es una de las estructuras cerebrales afectadas por alcohol. Análisis post-mortem de los cerebros de los alcohólicos crónicos han demostrado atrofia de la corteza cerebelosa (Eisenman, 2011). Sin embargo, no es la única estructura afectada está bien documentado que la ingestión incluso de bajas dosis de alcohol produce desordenes en el equilibrio y nistagmo en humanos. Así que bajas dosis de etanol podría afectar selectivamente la actividad neuronal en el núcleo vestibular además del cerebelo. Se ha reportado que la mayoría de las neuronas del núcleo vestibular lateral y células de Púrkinje son deprimidas por relativas dosis bajas de alcohol, sin embargo, esas observaciones solo se han observado en neuronas con disparo espontaneo (Ikeda, Sasa y Takaori, 1980).

Etanol deprime la descarga refleja monosináptica y polisináptica en la medula espinal, mientras la droga produce un incremento en la actividad de las células de Renshaw con estimulación del nervio motor. Ambos efectos inhibitorios y excitatorios del alcohol sobre el disparo espontaneo de neuronas únicas en el hipotálamo lateral, zona incerta, tálamo, corteza cerebral y locus coeruleus se han observado. Se encontró que etanol inhibe unidades únicas en el hipocampo, mientras que en el núcleo geniculado lateral resiste relativamente a la droga. Diferencias en los efectos y dosis dependientes de etanol se han demostrado en actividad multi-unitaria registrada de varias áreas del encéfalo (Ikeda y cols., 1980).

3. Opioides como moduladores de la corriente GIRK

Los opioides se encuentran entre las drogas más efectivas en el tratamiento del dolor severo, producen sus efectos analgésicos a través de la activación específica de los receptores localizados a lo largo de la vía de la percepción del dolor donde ellos inhiben el flujo de información nociceptiva. Esta inhibición es parcialmente realizada por la activación de canales rectificantes de entrada de potasio (GIRK o Kir3).

Los canales GIRK controlan la excitabilidad celular en el sistema nervioso central y en el corazón, porque su distribución es ubicua, los canales GIRK median los efectos de un gran rango de hormonas y neurotransmisores los cuales, tras la activación del correspondiente receptor acoplado a proteínas G permite la apertura del canal (Nagi y Pineyro, 2014).

Los opioides producen su acción a través de la activación de los receptores opioide μ (MOR), δ (DOR) y κ (KOR), todos se acoplan a proteínas Gi/o heterotrimecas. Como tal comparten adenilato ciclasa, fosfolipasa Cβ (PLCβ), canales de Ca^{2+} tipo N y canales de K+ rectificantes de entrada acoplados a proteínas G (GIRK) como canónicos efectores Gα y Gβγ (Nagi y Pineyro, 2014).

4. Excitabilidad neuronal y canales de potasio en las NAV

Las neuronas generan y transmiten información mediante cambios rápidos y transitorios en la diferencia del potencial a través de su membrana celular, La generación y propagación de estas señales discontinuas se logra por la presencia de canales iónicos en la superficie de las neuronas que son proteínas integrales de membrana y forman poros que permiten el paso selectivo de iones entre el interior y exterior de las células. Dicha propiedad es fundamental para el procesamiento de la información y las respuestas varían desde una o varias espigas hasta patrones repetitivos o irregulares de descarga dada por las propiedades del tipo celular, por la morfología y la distribución de los canales iónicos en la membrana celular; así, como por las propiedades de la red neuronal (Solís, López-Hernández y Cortés-Gasca. 2008).

Los canales de potasio son una familia diversa de canales iónicos con una amplia variedad de funciones en el sistema nerviosos central. En neuronas y otras células excitables estos canales mantienen el potencial de reposo y modulan la capacidad de iniciar y terminar los potenciales de acción. Y algunos canales de potasio han sido implicados como blancos de la acción de anestésicos. Los canales de potasio también son blanco de los alcoholes en el sistema nerviosos central (Lewohl y cols. 1999: Kobayashi y cols., 1999).

Los canales dependientes del voltaje selectivos para el K^+ juegan un papel clave en la excitabilidad neuronal, ya que son los responsables de la repolarización de la membrana neuronal, tras el disparo de un potencial de acción e intervienen en la definición de la propagación unidireccional de los potenciales de acción. Mientras los canales rectificadores de potasio ayudan a mantener el potencial de membrana de la célula relativamente constante. Los canales de K^+ se han clasificado de manera general en tres grandes familias con base en la homología de su estructura y sus características biofísicas (Solís y cols. 2008).

1. Canales con seis/siete segmentos transmembranales y un poro (6-7 STM/ 1P). Incluye los canales de K^+ voltaje dependiente (KV) (Figura 1.5). Las corrientes que se establecen a través de estos canales son: 1. Voltaje dependientes: IA (de transiente rápido), ID (retardada), IK (rectificadora tardía) e IM (activada por la despolarizacion y no inactivante). 2. Rectificadoras tardías y 3. Rectificadoras salientes.

Los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}). Constituye el segundo mayor grupo de canales selectivos al K^+. Aunque la mayor parte de estos canales son insensibles al voltaje y activados por las bajas concentraciones de Ca^{2+} intracelular, algunos son activados por el voltaje y el Ca^{2+} intracelular, y otros se activan por el Na^+ y Cl^- intracelular (Solís y cols. 2008).

2. Canales con dos segmentos transmembranales y un poro (2 STM/ 1P): Corresponde a canales de K^+ rectificadores entrantes (KIR) o KCNJ (Figura 1.5). Se les han llamado rectificadores entrantes porque tienen corriente rectificadora (cargas positivas) en dirección entrante, es decir que bajo potenciales electroquímicos iguales pero opuestos estos canales dejan pasar más corriente hacia el interior que hacia el exterior de la célula. Cuando el potencial de membrana empieza a ser menos negativo (despolarización celular) el canal se bloquea y el flujo saliente de K^+ es limitado. Con base en la secuencia de aminoácidos se conocen 7 subfamilias de KIR en el humano (KIR 1-7). En el SNC las corrientes descritas para esta familia de canales son las I_{K1} (rectificadora entrante), I_{GIRK} (activada por proteínas G), $I_{KIR\ 4.1}$ (dependiente de ATP) y la $I_{K(ATP)}$ (sensible a ATP) (Solís y cols. 2008).

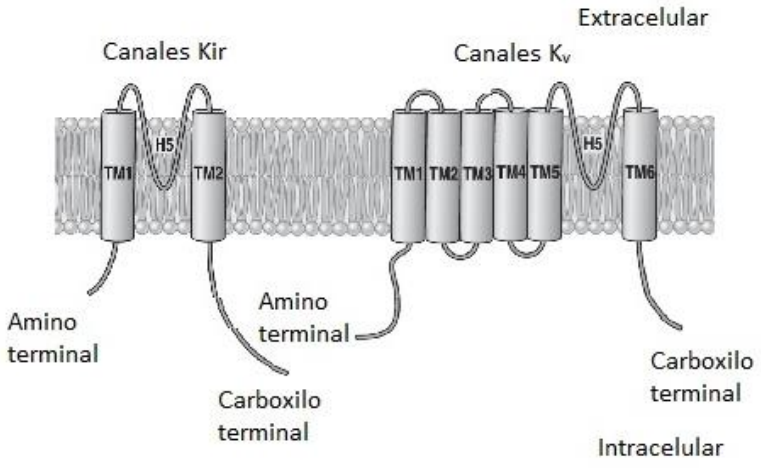


Figura 1.5. Estructura básica de los canales Kir y los canales K_V. *Estructura primaria de las subunidades de los canales Kir (izquierda). Cada subunidad Kir contiene dos regiones transmembrana (TM1 y TM2), un bucle formador de poro (H5) y una región citosólica NH_2 terminal y COOH terminal. Como comparación, la estructura de las subunidades de los canales de K^+ voltaje dependiente, los cuales poseen seis regiones transmembranales (TM1 - TM6), se muestra a la derecha (Modificado de Hibino y cols., 2010).*

Los canales Kir ayudan a mantener el potencial de reposo de una célula cerca del potencial de equilibrio del K+ (Kunkel y Peralta, 1995). Se han identificado 15 genes de la subunidad Kir y clasificado en siete subfamilias (Kir1.x a Kir7.x) (Figura 1.6). Con base en la secuencia de aminoácidos se conocen 7 subfamilias de Kir en el humano (Kir 1-7). En el SNC las corrientes descritas para esta familia de canales son las IK1 (rectificadora entrante), IGIRK (activada por proteínas G), I KIR 4.1 (dependiente de ATP) y la IK(ATP) (sensible a ATP) (Solís y cols., 2008).

3. Canales con cuatro segmentos transmembranales y dos poros. Es una familia que incluye a 15 miembros de canales de K^+ de dos poros. Desde el punto de vista electrofisiológico se les conoce como canales de fuga y son voltaje independiente, rectificadores entrantes o voltaje dependientes. Son regulados por diversos mecanismos entre los que están: la tensión de oxígeno, el pH, los lípidos, el estiramiento mecánico, los neurotransmisores y receptores acoplados a proteínas G. Son el blanco molecular de ciertos anestésicos volátiles y locales. Las corrientes descritas para estos canales en el SNC son rectificadoras entrantes, rectificadora abierta o voltaje dependiente (Solís y cols. 2008).

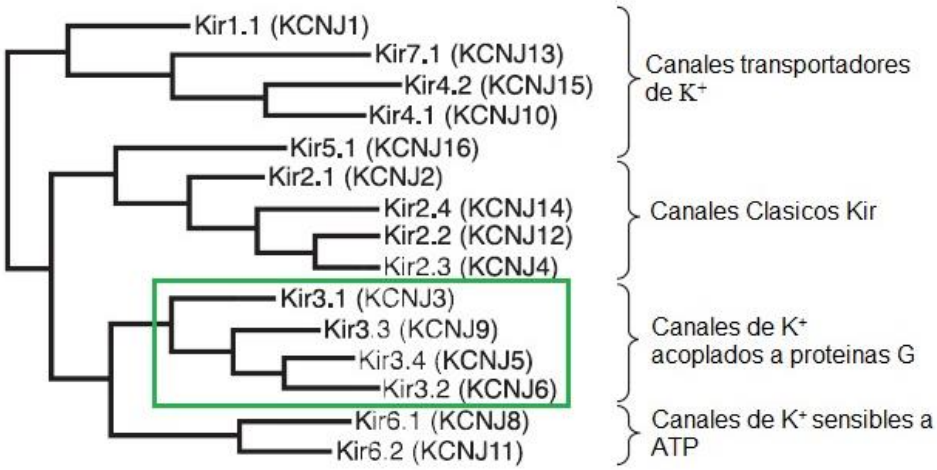


Figura 1.6. Árbol filogenético de los canales Kir. *Análisis filogenético de las 15 subunidades conocidas de canales Kir humanos. Se han clasificado en 4 grupos funcionales, el recuadro verde resalta las subunidades GIRK (Modificado de Hibino y cols., 2010).*

Se han descrito diversos canales de potasio en las neuronas aferentes vestibulares, en neuronas del nervio sacular del pez dorado se han descrito cuatro tipos de canales de potasio, tres de ellos dependiente de voltaje a los cuales se les denomino por su conductancia como: K (32), K (19) y K (12), y un cuarto tipo de canales activados por calcio, con una conductancia de 113 a 230 pS del tipo Big K^+. También se han descrito 4 corrientes ionicas en neuronas aferentes vestibulares aisladas en forma aguda del axolotl (*Ambystoma tigrinum*) tres corriente salientes de potasio (transitoria de salida $I_{K,\,A}$, rectificador retardado $I_{K,\,DR}$, y dependiente de Ca^{2+} $I_{K,Ca}$). Una corriente rectificadora de entrada de tipo I_{K1} (Soto y cols., 2002). En neuronas aferentes vestibulares en cultivo de rata se describió la presencia de las cuatro subunidades del canal activado por hiperpolarización y nucleótido cíclico (HCN), que generan la corriente activada por hiperpolarización (I_h) por activación de las vías de señalización mediadas por Adenosina Monofosfato ciclico (cAMP) (Almanza y cols., 2012). Aún no se ha reportado la presencia de la corriente GIRK en las NAV.

5. Canales GIRK estructura y función

Los canales rectificantes de entrada de potasio (Kir) están ampliamente expresados dentro del cerebro y la periferia donde juegan roles importantes controlando el potencial de membrana en reposo dentro de células excitables y no excitables. Los canales Kir ayudan a mantener el potencial de reposo de una célula cerca del potencial de equilibrio del K^+ (Kunkel y Peralta, 1995). Dentro de los canales Kir se encuentra la familia de canales rectificantes de entrada de K^+ acoplados a proteínas G (GIRK/Kir3). Cuatro subunidades han sido identificadas en mamíferos, denominados GIRK1-4 (también designados Kir 3.1-4) codificados por los genes KCNJ3, KCNJ6, KCNJ9 Y KCNJ5 respectivamente (Kaufman y cols., 2013; Xiao-fei, 2007; Lewohl y cols., 1999; Huang, Zhang, Kong, Zang, Jiang y cols., 2018; Mark y Herlitze, 2000).

Esas cuatro subunidades pueden formar homo y heterotetrameros con propiedades biofísicas únicas, regulación y distribución. Las subunidades GIRK muestran superposición, pero distintos patrones de expresión celular, que potencialmente producen subtipos de canales múltiples. Aunque la subunidad GIRK1 no puede formar homómeros funcionales por sí misma, puede ensamblarse con las subunidades GIRK 2,3 o 4, GIRK1 es una subunidad

integral del canal GIRK cardíaco formado por las subunidades GIRK ¼ y en la mayoría de los canales GIRK neuronales. GIRK1 confiere actividad robusta basal y dependiente del receptor a heterómeros GIRK, atribuible en parte a residuos únicos en el poro y el segundo dominio transmembrana. El dominio intracelular C-terminal también contribuye a la influencia potenciadora de GIRK1 en la actividad del canal, probablemente debido a la presencia de estructuras únicas que modifican la interacción entre el canal y Gβγ, Gα, y PIP2 (Mark y cols., 2000; Wydeven y cols., 2014; Lewohl y cols., 1999; Kofuji, Davison y Lester. 1995; Lesage, Guillemare, Fink, Duprat, Heurteaux y cols., 1995; Xiao-fei y cols., 2007) (Figura 1.7).

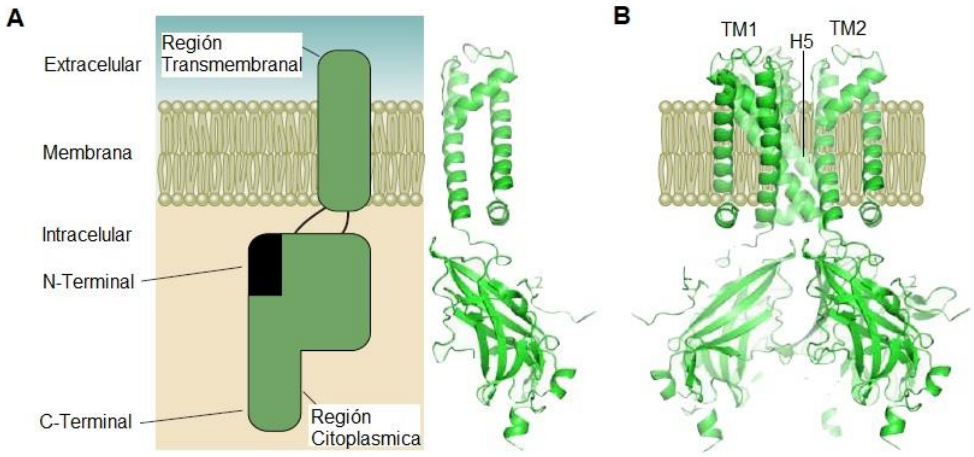


Figura 1.7. Estructura de los canales GIRK. *A: Rrepresentación esquemática de la estructura de un canal Kir genérico. El canal Kir está dividido en dominios transmembrana y citoplasmáticos. Las terminales NH2 y COOH son citosólicos y juntos contribuyen a la formación del dominio citoplasmático. B: Regiones transmembranales TM1 y TM2 unidos por la región H5 del canal GIRK.*

Los canales GIRK de tipo cerebral/neuronal son heteromultímeros compuestos de las subunidades GIRK ½ siendo los más comunes, esos canales están ampliamente expresados en la mayoría de las regiones del SNC como la corteza cerebral, hipocampo, cerebelo, área ventral tegmental (VTA) y en los ganglios de la raíz dorsal. A nivel periférico se han encontrado controlando la liberación de insulina en el páncreas, el tono vascular y la frecuencia cardiaca en el corazón. En el corazón los canales GIRK compuesto por las subunidades GIRK ¼ está altamente localizados en las células de los nodos auriculares y sinoauriculares donde están involucrados en la regulación de la frecuencia cardiaca.

La mayoría de los trabajos pioneros sobre canales iónicos regulados por proteínas G, fueron realizados sobre el canal de K^+ muscarínico activado por acetilcolina (K_{ACh}) responsable de producir la corriente de K^+ muscarínica activada por ACh (I_{KACh}), después se encontró que este canal estaba compuesto por las subunidades GIRK ¼. En 1921 Otto Loewi descubrió que la liberación de Acetilcolina (ACh) del nervio vago sobre el corazón da como resultado bradicardia y una disminución de la contractilidad cardiaca. Más tarde Del Castillo & Katz y Hutter & Trautwein mostraron que ACh conduce a una hiperpolarización de la membrana y una reducción de la frecuencia de potenciales de acción en corazones de rana, el cual fue mediado por un incremento en el eflujo de K^+ a través de la membrana. Además, que la hiperpolarización fue debido a un aumento en la conductancia del K^+. (Mark y cols., 2000; Kaufman y cols., 2013; Xiao-Fei, Hia-lin, Zhen-dong, Chang-lin y Cheng, 2007).

Polimorfismos y mutaciones en los canales GIRK en humanos han sido vinculados con arritmias, hyperaldosteronismo (asociados a hipertensión), esquizofrenia, sensibilidad a los analgésicos, dependencia al alcohol y epilepsia (Wydeven y cols. 2014; Sanchez y cols. 2017). La transducción de señales que implican proteínas G inhibitorias ($G_{i/o}$) ajusta la excitabilidad de las neuronas, los miocitos cardíacos y las células endocrinas, influye en el comportamiento, el gasto cardíaco y la homeostasis energética. Los canales GIRK son un efector común para las vías de señalización dependientes de $G_{i/o}$ en el corazón y el sistema nervioso (Wydeven y cols., 2014).

5.1. Moduladores de los canales GIRK

Los canales GIRK son activados por varios receptores acoplados a proteínas G (RAPG), tal como muscarinicos M2, adrenérgicos α, dopaminergicos D2, a receptores a oxitocina, $GABA_B$ receptores opioides μ-, δ- y κ y nociceptina/orfanina FQ u opioide like-1 (ORL-1) y además la activación directa de los canales GIRK por etanol que no implica vías de señalización acopladas a proteína G u otros segundos mensajeros citosólicos (Lewohl y cols. 1999; Xiao-fei y cols., 2007; Kobayashi y cols., 1999). Los canales GIRK son efectores rio abajo de los receptores acoplados a proteínas G, y pueden ser activados por la unión directa con la subunidad βγ de la proteína G en los canales, o por la interacción directa con alcoholes (Kaufman y cols. 2013; Lewohl y cols. 1999; Xiao-Fei y cols. 2007; Kunkel y cols. 1995).

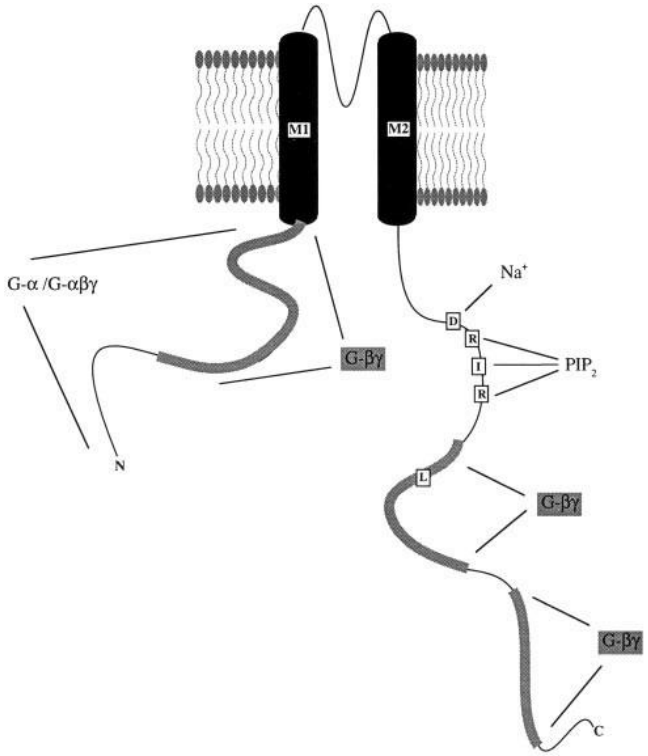


Figura 1.8. Representación esquemática de las regiones identificadas responsables de la interacción con proteína G, PIP2 y Na^+ en los canales GIRK. *Se han identificado sitios de unión a las subunidades de la proteína G en la terminal amino y carboxilo de los canales GIRK. Una mutación de un solo punto en el extremo carboxilo (Leucina (L) a glutamato (E) disminuye la unión a Gβγ. Se sugiere que Na^+ neutraliza el aspartato cargado negativamente (D) en la terminal carboxilo. Esto permite una unión más fuerte del PIP2. Además, la interacción de PIP2 con el canal está determinada por las dos cargas positivas de las argininas (R) y la isoleucina hidrofóbica neutral (I), que se encuentran al lado del aspartato (Tomado de Mark y cols., 2000).*

Los canales GIRK se activan mediante la unión de la subunidad Gβγ de la proteína G. La unión de la subunidad Gβγ refuerza la afinidad del canal por fosfatidilinositol - 4,5 - bifosfato (PIP2), un cofactor necesario para apertura del canal. En una resolución clara de la interacción canal-Gβγ con la cocristalización de Gβγ y un homómero GIRK2 se encontró que Gβγ se une a una superficie orientada hacia afuera creada por dos dominios citoplasmáticos GIRK adyacentes (las láminas βK, βL, βM y βN de una subunidad, y las láminas βD y βE de la subunidad adyacente. Los residuos de GIRK2 que median la interacción GIRK – Gβγ incluyen Q248 y F254 en βD – βE, y L342-T343-L344 en βL – βM. La interacción GIRK – Gβγ es electrostática, facilitada por los residuos de ácido glutámico y aspártico que se encuentran en el bucle βL – βM que atraen la cara de unión electropositiva en Gβγ. Es importante destacar que los elementos clave de esta interfaz de interacción se conservan en

todas las subunidades GIRK, incluida GIRK1. También el Na^+ intracelular (EC_{50} 30–40 mM) activa los canales GIRK neuronales y cardíacos de una manera dependiente de un residuo de ácido aspártico que se encuentra en el bucle βC – βD de GIRK2 y GIRK4, respectivamente. Este residuo, que contribuye al sitio de unión para Na^+, no se encuentra en GIRK1 (Kobayashi, 1999; Wydeven, 2014) (Figura 1.8).

Se han examinado los mecanismos subyacentes a la activación de canales GIRK por ML297, un miembro prototípico de una nueva familia de molécula pequeña como moduladores del canal GIRK. ML297 activa los canales GIRK a través de un mecanismo único que requiere dos aminoácidos específicos para la hélice de poros (F137) y el segundo dominio de extensión de membrana (D173) de GIRK1 como necesarios y suficientes para la activación selectiva de los canales GIRK por ML297. Se ha identificado a ML297 como un agonista potente y selectivo de los canales rectificantes de entrada de K^+ acoplados a proteínas G que contienen la subunidad GIRK1 de una manera que requiere fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) (Wydeven y cols. 2014; Kaufman y cols. 2013).

5.2. Alcoholes como moduladores de la corriente GIRK

Mientras la activación por alcohol no involucra vías de señalización por segundos mensajeros. Los alcoholes activan tanto los canales que contienen GIRK1 como los que se debilitan de manera independiente de la proteína G, sin alterar el fuerte perfil de rectificación. La bolsa de unión al alcohol hidrófobo en los homómeros GIRK2 está formada por un residuo en el extremo N (Y58) y dos residuos en la lámina βL – βM de una subunidad (L342 e Y349), junto con tres residuos en la lámina βD – βE de la subunidad adyacente (I244, P256 y L257). Como es el caso de las estructuras involucradas en la mediación de las interacciones del canal con Gβγ, las estructuras que median las interacciones canal-alcohol se conservan en gran medida en GIRK1 (Wydeven y cols., 2014).

Mientras que la activación del canal a través de Gβγ, etanol y Na^+ implica determinantes estructurales únicos, estos agentes (y ML297) requieren PIP2 unida a la membrana para activar los canales GIRK. PIP2 interactúa con los residuos de lisina encontrados en la interfaz entre los dominios transmembrana y citoplasmático de las subunidades GIRK. La unión de Gβγ, etanol y Na^+ a los canales GIRK fortalece la afinidad del canal por PIP2. la unión de PIP2 desencadena una rotación de las hélices transmembrana internas, desplazando la puerta

helicoidal interna que se encuentra en la unión de los dominios transmembrana y citoplasmático. Con PIP2 presente, los canales GIRK están "cebados" para la activación. De hecho, la unión de Gβγ (en presencia de PIP_2) conduce a la apertura de la puerta helicoidal interna y la puerta del bucle G, que está formada por la cara interna de los dominios citosólicos; Gβγ en ausencia de PIP2 solo puede abrir la puerta del bucle G. (Wydeven y cols., 2014).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El vértigo, el mareo y el desequilibrio son los principales síntomas de los trastornos vestibulares. Estos síntomas pueden llevar a consecuencias físicas, como la reducción del control postural, caídas, y a consecuencias psicológicas y psiquiátricas, como depresión, ansiedad, pánico, agorafobia y defectos cognitivos, especialmente en los ancianos (Soto y Vega. 2010). En niños con problemas de fijación de la mirada asociado con disfunción vestibular pueden llevar a problemas de lectura y repercutir sobre su desarrollo cognitivo. Y los adultos con lesiones vestibulares bilaterales tienen atrofia del hipocampo y sufren alteraciones cognitivas espaciales y no espaciales. (Wiener-Vacher y cols., 2013). Dentro del tratamiento de los trastornos vestibulares existen fármacos que tienen efecto directo sobre la dinámica neuronal, como aquellos que actúan sobre canales iónicos dependientes de voltaje, gracias a la expresión diferencial de los tipos de canales iónicos, pueden contribuir a diferenciar la acción de las drogas a nivel central y periférica y ofrecer efectos selectivos, (Soto, Vega y Seseña., 2013).

Los opioides y el etanol se han utilizado desde la antigüedad para aliviar el dolor, dentro de las vías de señalización de opioides incluye a los canales GIRK activados por proteínas G, por otro lado, etanol induce una variedad de fenómenos fisiológicos a través de varias proteínas, incluidos los canales GIRK, La activación del canal GIRK por proteínas G o etanol está reducida en ratones mutantes *weaver*. La analgesia reducida mediante el uso de opioides o etanol en ratones mutantes *weaver* sugiere que los canales GIRK son efectores importantes tanto en el uso de opioides como de etanol. Por lo tanto, el canal GIRK es potencialmente uno de los blancos moleculares clave para promover la comprensión del sistema de control del dolor y en el desarrollo de analgésicos avanzados con menos efectos adversos (Ikeda y cols., 2002). Se necesita una mejor comprensión de la dinámica de descarga de las neuronas aferentes vestibulares para entender completamente las interacciones entre el procesamiento de la información periférica hacia la integración central. Todo esto nos lleva a cuestionarnos ¿Las neuronas aferentes vestibulares expresan funcionalmente a la corriente GIRK y cuál es su importancia sobre la dinámica de los potenciales de acción?

HIPÓTESIS

Las neuronas aferentes vestibulares expresan la corriente de potasio rectificante de entrada activada por proteínas G (GIRK), la cual participa en la dinámica de la frecuencia de descarga de potenciales de acción.

JUSTIFICACIÓN

Las neuronas aferentes vestibulares son la principal vía de estrada del sistema vestibular y tienen alta regulación por muchas sustancias neuroactivas entre ellas se encuentran los péptidos opioides dadas por las terminaciones eferentes y propias de las sinapsis con las células ciliadas (Soto, Vega y Seseña., 2013), los péptidos opioides puedes estar regulando la descarga de los potenciales de las neuronas aferentes vestibulares y, por lo tanto, la ganancia de la entrada vestibular.

Es importante terminar de sentar las bases electrofisiológicas de las neuronas aferentes vestibulares para entender la dinámica de descarga funcional como principal vía de entrada del sistema vestibular hacia los núcleos vestibulares. Dentro de la gama de canales de potasio rectificantes de entrada activados por hiperpolarización, se encuentran los canales GIRK y en las NAV aún no descritos, además que su regulación puede estar dada por los propios péptidos opioides endógenos del sistema vestibular.

La electrofisiología nos permitirá identificar la posible función de los canales GIRK activados por varios RAPG, tal como receptores MOR, DOR, KOR, y Nociceptina/Orfanina FQ (ORL-1) (Ikeda y cols., 2002) así como la modulación de la dinámica de descarga de las NAV. Pero también nos ofrecerá un nuevo blanco terapéutico para solucionar posibles patologías relacionadas con el sistema vestibular.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar mediante registros electrofisiológicos si las neuronas aferentes vestibulares en cultivo expresan la corriente GIRK, y en dado caso si dicha corriente es modulada por opioides.

Objetivos particulares

- Evidenciar mediante registros de fijación de voltaje y alcoholes (etanol 30 mM y 100 mM; butanol 30 mM y 100 mM) si las neuronas aferentes vestibulares en cultivo expresan la corriente GIRK.
- Evidenciar mediante registros de fijación de voltaje y el agonista específico ML297 si las neuronas aferentes vestibulares en cultivo expresan la corriente GIRK.
- Determinar mediante registros de fijación de corriente y alcoholes (etanol 30 mM y 100 mM; butanol 30 mM y 100 mM) si la descarga dinámica de potenciales de acción es modulada en las neuronas aferentes vestibulares.
- Determinar mediante registros de fijación de corriente y opioides (DAMGO 3 µM y N/OFQ 3 µM) si la descarga dinámica de potenciales de acción es modulada en las neuronas aferentes vestibulares.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. NORMAS BIOÉTICAS

Todos los procedimientos con animales del laboratorio se realizaron conforme a lo establecido por la norma oficial mexicana NOM- 062—ZOO-1999 y el comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL), donde este proyecto está registrado con clave: SOEE-UALVIEP-18-1. Todo esto para garantizar las medidas de bioseguridad y uso correcto de los animales.

2. CULTIVOS NEURONALES

Para los experimentos se utilizaron ratas Long Evans de la cepa CII de edades entre 7 a 10 días postnatales (P7-P10) y ratas prepubertas de 28 a 30 días (P28-P30 días) sin distinción de sexo, las cuales se obtuvieron del Bioterío “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las ratas fueron anestesiadas usando sevoflurano y sacrificadas por decapitación de manera cuidadosa, rápida y precisa con unas tijeras de disección.

La cabeza fue rigurosamente limpiada con alcohol al 70 %, se removió la mandíbula inferior, se abrió la bóveda craneana y se eliminó el encéfalo. Se realizó la micro disección con la ayuda de un microscopio estereoscópico en campo estéril dentro de una campana de flujo laminar. Durante el procedimiento el explante se mantuvo inmerso en medio Leibovitz (Gibco L15 100%). Se secciono el nervio óptico en la porción localizada entre las articulaciones anterior y posterior del hueso esfenoides para descubrir la zona del meato auditivo interno donde se encuentran superficialmente los ganglios vestibular y facial uno lateral y otro medial respectivamente (Figura 2.1 A), resecando entonces los ganglios vestibulares derecho e izquierdo (Soto y cols., 2002). Posteriormente se colocaron los ganglios vestibulares en medio Leibovitz (Gibco L15) adicionado con 1.25 mg/ml de tripsina y 1.25 mg/ml de colágenasa tipo IA y se incubaron por 20 min a 37 °C para proceder a la disociación enzimática y mecánica.

A) **B)**

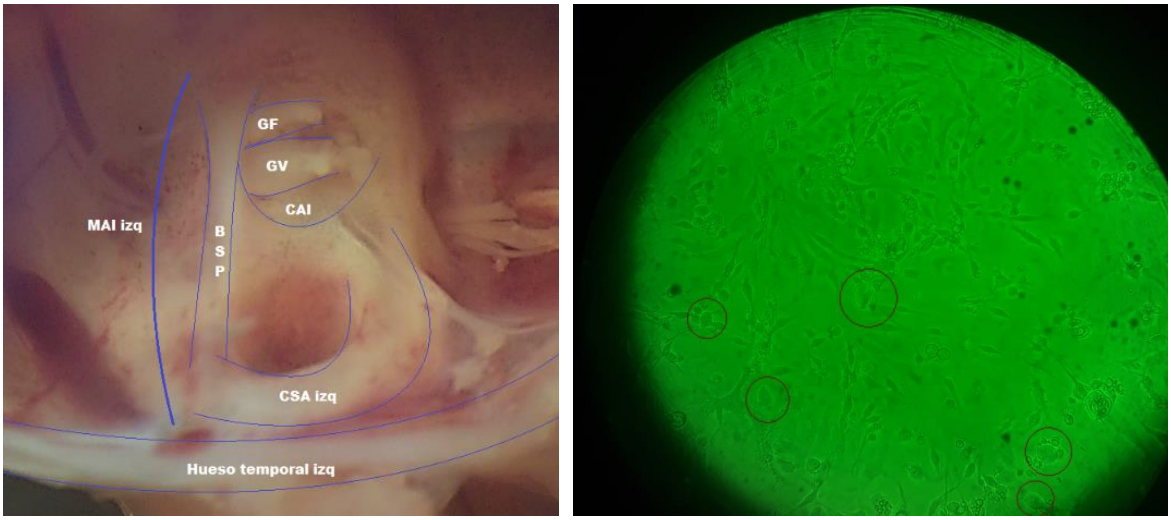


Figura 2.1. Meato auditivo interno y cultivo de NAV. A) *Vista superior del meato auditivo interno de la rata, ubicado de forma anteroposterior de izquierda a derecha, se observan diferentes estructuras anatómicas, GV = ganglio vestibular, GF = ganglio facial, CAI = conducto auditivo interno, MAI meato auditivo interno, CSA = canal semicircular anterior, BSP = borde superior del peñasco.* ***B)*** *Cultivo de las NAV vistas en un microscopio de contraste de fase después de 24 horas en incubación, dentro de los círculos rojos células potencialmente registrables.*

Para la disociación mecánica de los ganglios vestibulares se utilizó dos pipetas Pasteur pulidas con fuego de diferentes diámetros hasta tener una solución homogénea y centrifugamos a 2500 x g por cinco minutos. El sobrenadante fue desechado y reemplazado por medio L15, el proceso fue repetido una vez más. Las células disociadas fueron sembradas en vidrios de cubreobjetos pretratados con 100 µg/ml de poli-D-lisina (Sigma Aldrich) dentro de cajas de cultivo de 35mm x 10mm (Corning, NY, 14831) con 2 ml de medio L 15 modificado (Suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 1000 IU de penicilina, 15.7 mM de NaHCO3, 15.8 mM HEPES, y el pH fue ajustado a 7.7 con NaOH). (Seseña, Vega y Soto., 2014). Las células fueron mantenidas en una atmosfera de 95% de aire y un 5 % de CO2 en una incubadora húmeda (NUAIRE, US AUTOFLOW) a 37 °C por 18-24 horas hasta el registro electrofisiológico (Figura 2.1. B). Se realizaron series experimentales con ratas P28-P30 días por lo que se siguió la misma metodología de los cultivos de neuronas aferentes vestibulares de las ratas P7-P10 días.

3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

3.1 Set de registro

El set de registro electrofisiológico (*Patch Clamp*) que se usó contiene un microscopio invertido de contraste de fase (Nikon Eclipse, TS-100), un cabezal con soporte de policarbonato (*Pipette Holder*, HEKA EPC-800) para pipetas de borosilicato y un micromanipulador con controlador de velocidad MP-285 (SUTTER INSTRUMENT Co.) montados sobre una mesa anti-vibratoria dentro de una jaula de Faraday. Además de un sistema de micro-perfusión con controlador de válvulas (Warner VC-6) y controlador de posición (Warner SF-77B). Las señales fueron registradas con un amplificador (HEKA EPC-800), un conversor analógico digital (Digidata 1550, Molecular Devices) conectados a una computadora con Windows 7. Se usó el software de registro pClamp 10.4 (Axon Inst., Molecular Devices) para visualizar las señales.

Las células en cultivo con 24 de incubación se llevaron a una cámara de registro de un microscopio invertido (Nikon Eclipse, TS-100) con iluminación de contraste de fase, montado sobre una mesa antivibratoria. Se realizaron experimentos de fijación de voltaje (*Voltage Clamp*) y fijación de corriente (*Current Clamp*) en la modalidad de célula completa (*Whole Cell*) usando capilares de vidrio de borosilicato (micropipetas TW120- 3, GL1.2 OD/ 9 de WPI) con un diámetro exterior de 1.5 mm llenos con solución intracelular normal, los cuales se fabricaron en un estirador de pipetas (MICROPIPETTE PULLER P-97, SUTTER INSTRUMENT CO.) que permitió obtener puntas con resistencia de 1.5 a 5 MΩ.

Los capilares de vidrio fueron colocados en el soporte para pipetas y llevados hasta la célula con un micromanipulador generando un sello perfecto de 1 GΩ (Giga-sello) entre la membrana celular y la boca del electrodo. Una vez hecho el Giga-sello se procedió a romper la membrana de la célula para dar continuidad entre el medio interno de la célula y la solución dentro del capilar de vidrio.

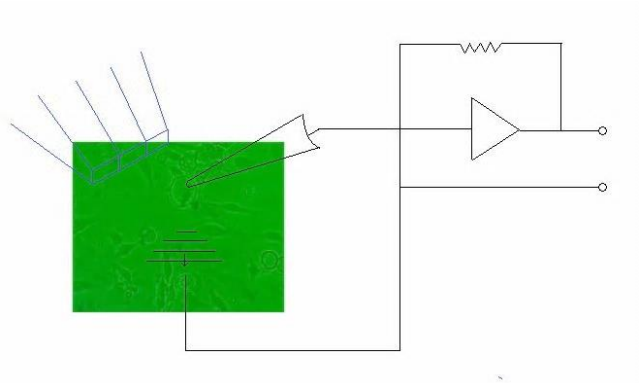


Figura 2.2. Registro electrofisiológico de las NAV después de 24hrs de cultivo. *Las células fueron bañadas por un sistema de microperfusión con tubo cuadrado con tres terminales y las señales fueron generadas mediante una tarjeta conversora analógico-digital (Digidata).*

La cámara de registro se perfundió usando un sistema de microperfusión con controlador de apertura y cierre de válvulas para administrar las soluciones extracelulares directo a las células. Las soluciones se liberaron en un tubo cuadrado con tres terminales y para la aplicación de drogas se usó el mismo sistema de eyección por controlador de válvulas y se liberó el fármaco por una de las terminales de microtubo cuadrado alternado así entre las soluciones control y las soluciones con la droga (Figura 2.2). Se usó un amplificador de fijación de voltaje (HEKA, Patch Clamp, EPC 800) y las señales de comando y adquisición de datos se generaron mediante una tarjeta de conversión analógica- digital (AXON INSTRUMENTS, Digidata 1550) controlada por el programa pClamp 10.4 en donde se visualizó los registros electrofisiológicos de cada célula. La capacitancia y la resistencia fueron compensadas electrónicamente al 30%.

3.2 Soluciones de registro

Para los registros electrofisiológicos se elaboraron dos tipos de soluciones, intracelulares y extracelulares, que ayudaron al mantenimiento de las propiedades fisiológicas de las células. Las soluciones tuvieron las siguientes concentraciones expresadas en mM mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Soluciones de registro

Solución intracelular normal (mM): 10 NaCl, 125 KCl, 0.134 $CaCl_2$, 10 EGTA, 5 HEPES, 1.8 ATP-Mg^{2+}, 0.9 GTP- Na^{+}.
Solución extracelular normal (mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl2, 1.5 CaCl2, 10 HEPES.
Solución tyrode con buffers de fosfatos (mM): 118 NaCl, 2.5 KCl, 1 MgCl2, 2.5 CaCl2, 25 NaHCO3, 1 Na2HPO4.
Solución extracelular alto K+ 40 mM (mM): 40 KCl, 105.4 NaCl, 1.2 MgCl2, 1.8 CaCl2, 10 HEPES.
Solución extracelular alto K+ 20 mM (mM): 20 KCl, 125.4 NaCl, 1.2 MgCl2, 1.8 CaCl2, 10 HEPES.

Tabla 1. Las soluciones extracelulares fueron adicionadas con Dextrosa 10 mM y ajustadas a pH 7.4 con HCl 1 M y las soluciones intracelulares fueron ajustadas a pH 7.2 con KOH 1 M, manteniendo una Osmolaridad teórica cercana a 300 mOsm en todas las soluciones. Na2HPO4 = Fosfato de sodio, Dibasico, Anhidro.

3.3 Fármacos

Tabla 2 Fármacos

DAMGO (D -Ala, N -Me-Phe, Gly-ol - encefalina)	PM = 513.59 g/mol, diluido a 25 mg/ 0.5 ml de agua desionizada. Se perfundió a [3µM] y [6 µM], (Sigma-Aldrich).
NOCICEPTINA (N/ OFQ)	PM = 1809.04 g/mol, diluido a 1 mg/ ml de agua desionizada. Se perfundió a [3µM], (Sigma-Aldrich).
ML297 (1-(3,4-Difluorophenyl)-3-(3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-yl) urea)	PM = 328.32 g/mol, diluido a 15 mg/ml en DMSO. Es un agonista selectivo de los canales GIRK que contiene la subunidad GIRK1. Se perfundió a [3µM], (Sigma-Aldrich).
ETANOL (C_2H_6O), 94.9- 96° G.L.	PM = 46.07 g/mol, densidad = 0.789 g/cm3 a 20 °C. Agonista inespecífico de los canales GIRK, [30 mM] y [100 mM] (de HYCEL).
BUTANOL ($C_4H_{10}O$)	PM = 74.12 g/mol, densidad = 0,81 g / ml. Agonista inespecífico de los canales GIRK, [30 mM], [100 mM] y [1 M] (J.T. Baker Analyzed).
ISOPROPANOL (C_3H_8O)	PM = 60.10 g/mol, densidad = 0,785 g/ml. Agonista inespecífico de los canales GIRK, [100 mM] y [1 M] (Meyer).

Tabla 2. Los fármacos hidrosolubles fueron disueltos en agua desionizada y los fármacos liposolubles fueron diluidos con DMSO, colocados en alícuotas y refrigerados a -20 °C.

3.4 Protocolos de estimulación

En la modalidad de fijación de voltaje (*Voltage Clamp*) se aplicó un protocolo de pulsos crecientes de -100 mV a 50 mV, que inicio en un voltaje de -70 mV, después de 15 ms dio un pequeño pulso hiperpolarizante a -75 mV por 5 ms y regreso a – 70 mV durante los primeros 100 ms, posteriormente dio pulsos crecientes despolarizantes de 400 ms de duración que partieron de -110 mV a 50 mV con una Δ = 10 mV y 3 segundos inter pulsos, al final dio un pulso fijo de -10 mV durante 50 ms y regresó al voltaje de -70 mV (Figura 2.3. A). Este protocolo se utilizó para visualizar la corriente de sodio en las células y determinar por ende si eran neuronas (Figura 2.3. B y C).

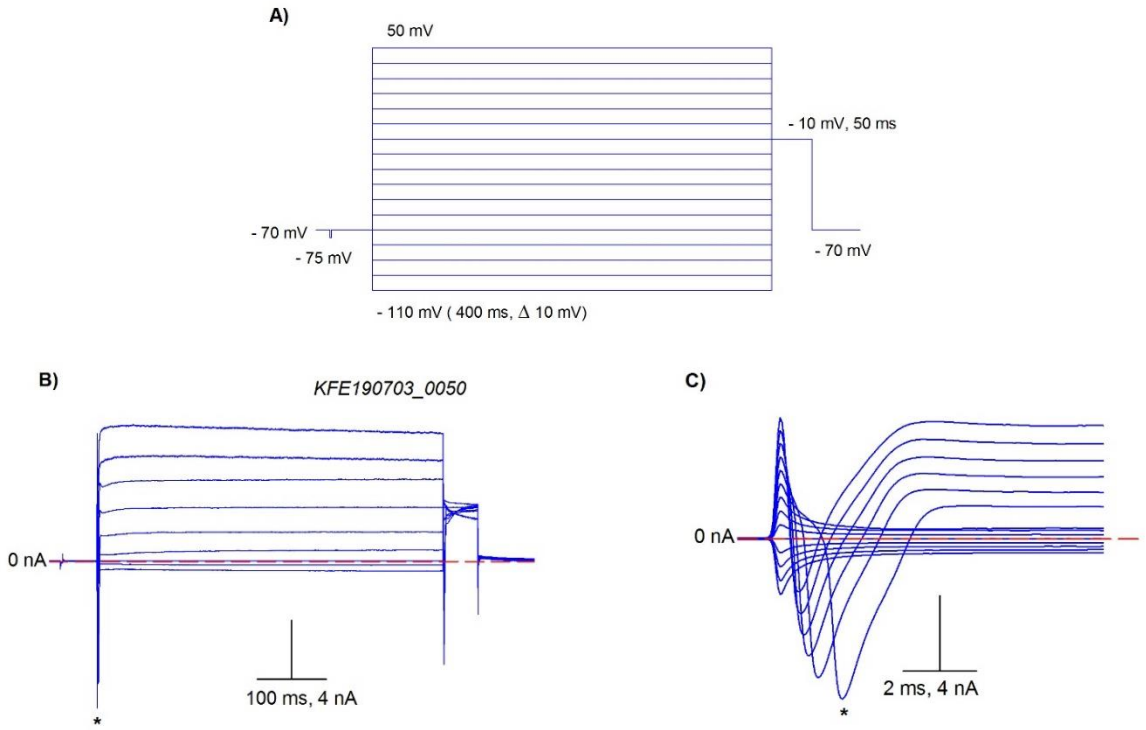


Figura. 2.3. Protocolo de pulsos crecientes. A) *Protocolo de pulsos crecientes de -100 mV a 50 mV.* ***B)*** *Trazo representativo del protocolo de pulsos crecientes, donde se observa la activación de las corrientes totales (entrantes y salientes), por convención las corrientes que se encuentran por arriba de la línea roja punteada son salientes y por debajo de esta son corrientes entrantes. El asterisco indica la activación de la corriente de sodio que fue graficada en C.* ***C)*** *Ampliación al inicio del protocolo en los pulsos crecientes, se observa la activación de la INa^+ (2-3 ms).*

También se utilizó un protocolo de pulsos en sentido hiperpolarizante de -70 mV a -130 mV, que inicio de un voltaje de sostenimiento de -70 mV, a los 30 ms dio un pequeño pulso

hiperpolarizante a – 75 mV durante 5 ms y regreso al voltaje de – 70 mV hasta los 100 ms, después dio pulsos crecientes hiperpolarizantes de 500 ms de duración que partieron de -70 mV a -130 mV con Δ = 20 mV y 5 segundos entre cada pulsos, al final regresó al voltaje de -70 mV, como se aprecia en la figura 2.4. A. Este protocolo se utilizó para estudiar la corriente rectificante de entrada de potasio acoplada a proteínas G (GIRK) (Figura 2.4. B).

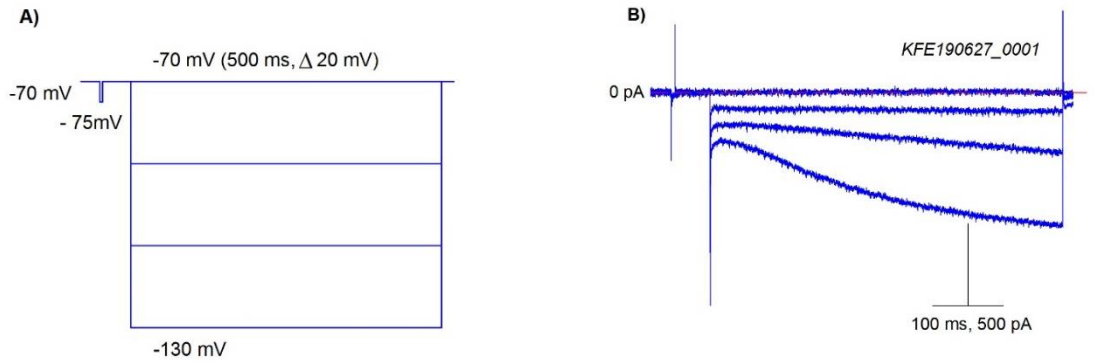


Figura. 2.4. A) *Protocolo de pulsos hiperpolarizantes -70 mV a -130 mV.* ***B)*** *Trazo resultante del protocolo de pulsos hiperpolarizantes -70 mV a -130 mV, se observa la activación de las corrientes rectificantes de entrada de potasio.*

Se utilizó un protocolo de pulsos crecientes en sentido hiperpolarizante de -100 mV a -150 mV, inicio en un voltaje de sostenimiento de -80 mV, después de 20 ms dio un pequeño pulso despolarizante a -75 mV durante 5 ms y regreso al voltaje de – 80 mV hasta los 100 ms, posteriormente siguieron los pulsos crecientes en sentido hiperpolarizante con 500 ms de duración de – 100 mV a -150 mV con Δ = 10 mV y 4 segundos inter pulsos, al final regreso a un pulso de – 80 mV (Figura 2.5. A).

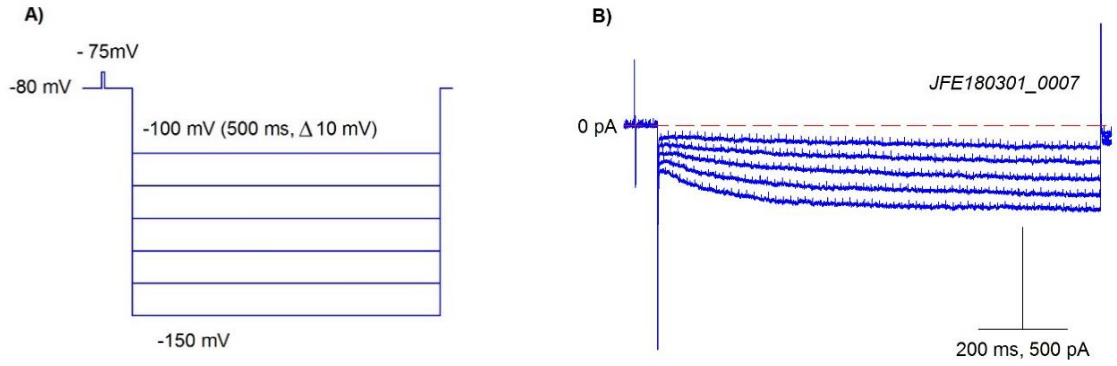


Figura. 2.5. Protocolo de pulsos hiperpolarizantes A) *Protocolo de pulsos hiperpolarizantes -100 mV a -150 mV.* ***B)*** *Trazo resultante del protocolo de pulsos hiperpolarizantes de -100 mV a -140 mV se omitió el sweep de -150 mV, se observa la activación de las corrientes rectificantes de entrada de potasio.*

Se utilizó un protocolo de rampa de -150 mV a -50 mV con una duración de 500 ms, el protocolo inicio en un voltaje de sostenimiento de -80 mV después dio un pulso despolarizante a -75 mV durante 5 ms y regreso a -80 mV hasta los 100 ms, posteriormente dio un pulso hiperpolarizante en rampa que empezó en -150 mV y termino en -50 mV durante 500 ms y para finalizar regreso a un pulso -80 mV durante 100 ms (Figura 2.6.A). Este protocolo se repitió por 31 veces con 5 segundos inter pulsos. Se usó el protocolo en rampa para estudiar el efecto de los alcoholes sobre la corriente GIRK en las NAV (Figura 2.6. B).

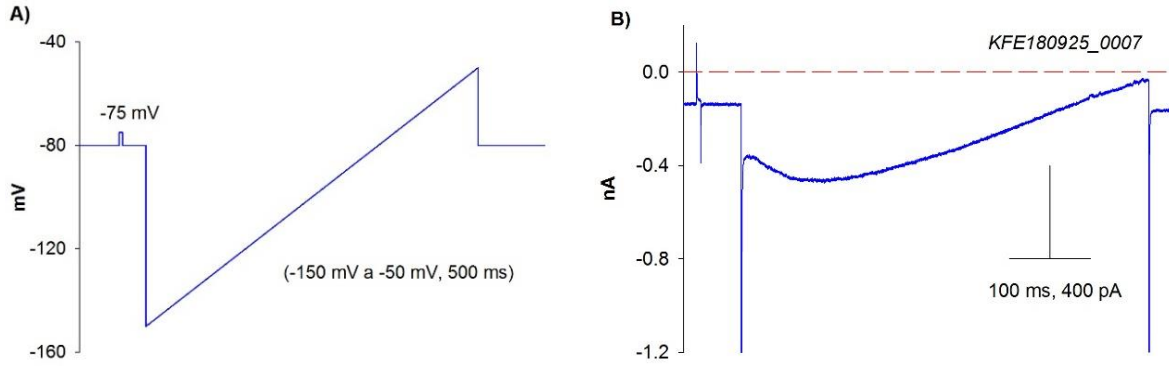


Figura. 2.6. Protocolo de rampa A) *Protocolo de rampa de -150 mV a -50 mV con una duración de 500 ms.* ***B)*** *Trazo resultante de la aplicación del protocolo en rampa -150 mV a -50 mV, se observa la activación de las corrientes de K^+ rectificantes de entrada.*

Para evaluar la excitabilidad neuronal y el impacto de la corriente GIRK sobre la descarga dinámica de PA. Se utilizaron diferentes protocolos de estimulación en la modalidad de fijación de corriente (*Current Clamp*). Para producir los PA, se utilizó un protocolo de pulso crecientes despolarizantes de -150 pA a 450 pA, el voltaje de sostenimiento fue de -70 mV o -80 mV, el protocolo inicio de un pulso sin estimulación (0 pA) durante 20 ms, posteriormente se dieron pulsos crecientes con duración de 500 ms en un rango de -150 pA a 450 pA con $\Delta = 50$ pA y 4 s inter pulsos, para terminar en un pulso sin estimulación (Figura 2.7. A). El protocolo se utilizó para determinar el rango de estimulación aproximado en el cual se genera el primer PA (Figura 2.7. B).

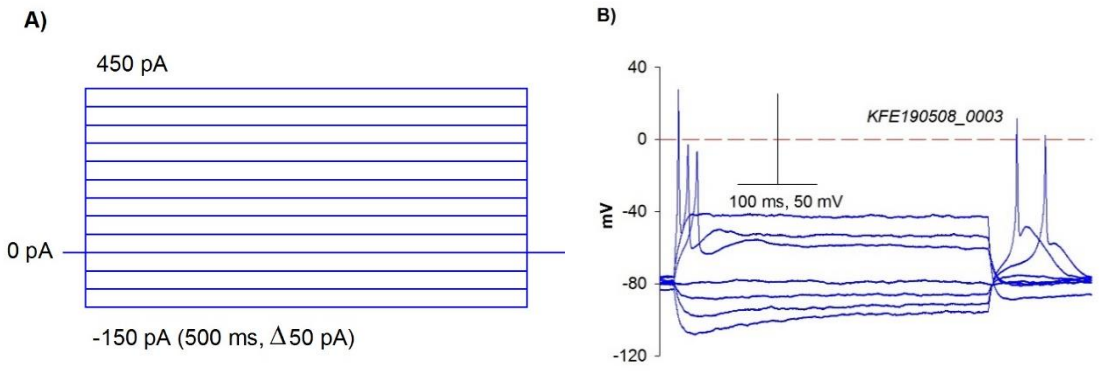
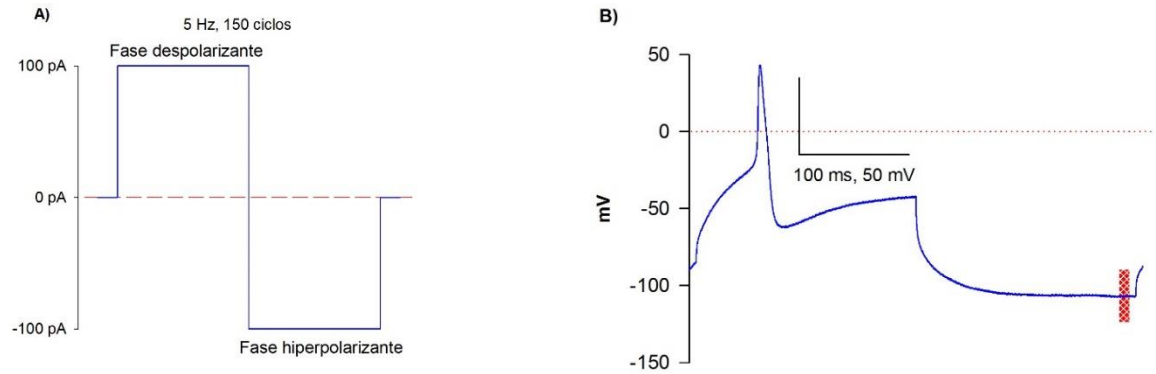


Figura. 2.7. Protocolo de pulsos crecientes A) *Protocolo de pulsos crecientes de -150 pA a 450 pA.* ***B)*** *Trazo representativo de la descarga de PA se eliminaron algunos pulsos para que se visualizara mejor la imagen, se consideraron PA todas las espigas que tuvieron sobretiro y rebasaron el cero por arriba de la línea roja, se observa descarga de PA al inicio del protocolo y PA de rebote al final del protocolo.*

Para evaluar la morfología del PA y la descarga dinámica de PA se utilizó un protocolo de tren de 150 pulsos cuadrados. El protocolo inicio con un pulso cuadrado despolarizante seguido de un pulso cuadrado hiperpolarizante que se repitió 150 veces a una frecuencia de 5 Hz (5 ciclos / s) (Figura 2.8. A), la duración total del protocolo fue de 30 segundos. Este protocolo nos permitió observar PA en las NAV, (Figura 2.8. B). La descarga dinámica de PA se produjo de acuerdo a la amplitud de estimulación en un rango de 35 pA a 400 pA donde se pudo observar que debido a cambios en la estimulación se produjo descargas supraumbrales donde todos los pulsos cuadrados presentaron PA (Figura 2.8 C) y donde no se presentó ninguno (Figura 2.8 D).



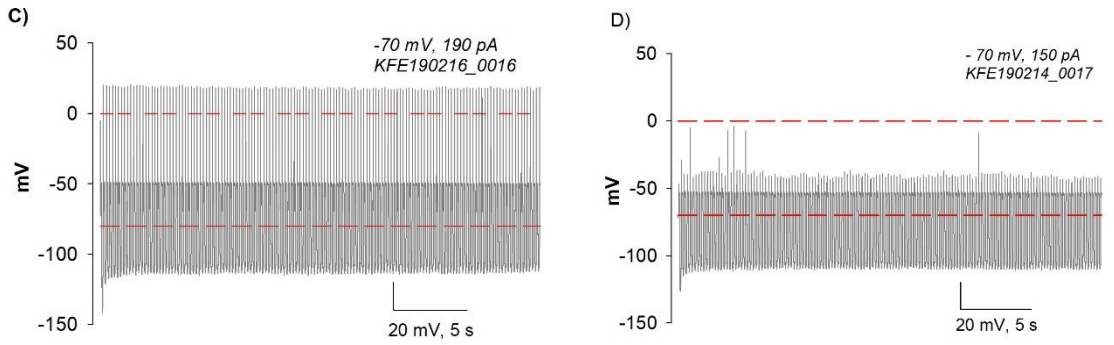


Figura. 2.8. Protocolo de tren de 150 pulsos cuadrados A) *Protocolo de tren de 150 pulsos cuadrados despolarizantes e hiperpolarizantes a una frecuencia de 5 Hz.* ***B)*** *Trazo representativo de la descarga de PA por el protocolo de tren de 150 pulsos cuadrados, se puede observar el sobretiro, el recuadro rojo indica el tiempo (ms 200-201) donde fue medida la fase hiperpolarizante.* ***C) y D)*** *Descarga dinámica producida por el tren de pulsos cuadrados durante 30 segundos, en C se observa un trazo representativo de la descarga dinámica de PA supraumbral donde todos los pulsos cuadrados presentaron PA y en D descarga subumbral donde ningún pulso cuadrado presento PA.*

4. ANÁLISIS

4.1. Análisis de los registros en *Voltage Clamp*

En la modalidad de *Voltage Clamp* se pasó un protocolo de pulsos crecientes de -110 mV a 50 mV (500 ms de duración y Δ de 10 mV) donde se observó las corrientes totales de las células y solo aquellas que presentaban la corriente de sodio se tomaban como filtro para discriminar las que eran neuronas de otro tipo de células como las células gliales y de soporte, las células neuronales se les aplicaba el resto de los protocolos.

También utilizamos un protocolo de pulsos crecientes en sentido hiperpolarizante de -100 mV a -150 mV, (duración de 500 ms y Δ 10 mV entre cada pulso). Se perfundió solución control, solución alto potasio 20 mM y lavado, solución alto potasio 40 mM y finalmente un segundo lavado, cada condición se pasó en un protocolo diferente. El análisis se realizó en la parte inicial de cada protocolo después de la corriente instantánea se tomó la corriente inicial (I_i) y al final de cada pulso en la corriente final (I_f) antes del trazo capacitivo, se restó la corriente inicial a la corriente final (I_f - I_i) y se obtuvo la diferencia. Se construyó la gráfica I-V de corriente contra voltaje de cada una de las condiciones y se compararon estadísticamente.

Se utilizó un protocolo en rampa con pulsos de voltaje hiperpolarizante de -150 mV a -50 mV con una duración de 500 ms (Figura 2.6) en las NAV de ratas P7-P10 días, La corriente analizó en el voltaje de -140 mV. Los pulsos pasaron cada 5 segundos, se tomaron los primeros 30 segundos control, 1 minuto aplicación de alcoholes y 30 segundos lavado y se compararon estadísticamente las tres condiciones.

Se usó el protocolo de pulsos hiperpolarizantes de -70 mV a -130 mV (500 ms de duración y Δ de 20 mV) donde se perfundió en un protocolo una solución control, en otro protocolo el fármaco ML297 y un protocolo para el lavado. El análisis se realizó en la parte inicial del protocolo después de la corriente instantánea, se tomó la corriente inicial (I_i) y al final de cada pulso se tomó la corriente final (I_f) antes del trazo capacitivo, en la resta de la corriente inicial a la corriente final (I_f - I_{inst}) se obtuvo la diferencia. Se construyó la gráfica I-V de corriente contra voltaje de cada una de las condiciones y se compararon estadísticamente.

4.2. Análisis de los registros en C*urrent Clamp*

En los experimentos de *Current Clamp* se utilizó un protocolo de pulsos creciente de -150 pA a 400 pA (500 ms, Δ 50 pA) se analizó la corriente (en pA) al cual se presentó el primer potencial de acción, la cual se tomó como referencia para saber el nivel de estimulación aproximado para el protocolo de tren de pulsos cuadrados.

En el protocolo de tren de pulsos 150 pulsos cuadrados en sentido despolarizante e hiperpolarizante (200 ms de duración) a 5 Hz y con estimulación variable, la forma en que se hicieron los experimentos fue la siguiente: primero en un protocolo completo se perfundió solución control, en otro se perfundió el fármaco y un último protocolo para el lavado. Se analizó el efecto sobre la descarga dinámica de PA para etanol (30 mM y 100 mM) y butanol (30 mM y 100 mM), DAMGO (3 µM y 6 µM) y N/ OFQ (3 µM), se contabilizo el número de potenciales de acción y se comparó el número de potenciales de acción entre cada una de las condiciones. Adicionalmente se analizó el efecto de los fármacos sobre la fase hiperpolarizante al final de cada pulso cuadrado (ms 200- 201). Se graficaron las tres condiciones (control, la aplicación del fármaco y el lavado) y se compararon estadísticamente.

4.3. Análisis estadístico

Los registros fueron analizados con los programas Clampfit 10.6 (de Axon), Microsoft Excel 2013 (Microsoft Co.) y Sigma Plot 11.0 (de Systat Software, Inc.). Los resultados se representaron como promedio ± error estándar. Los análisis estadísticos se obtuvieron con una prueba t –student de dos colas, pareada y se consideraron estadísticamente significativos con un $\alpha \leq 0.05$.

RESULTADOS

1. PROPIEDADES PASIVAS DE LAS NAV

Para los registros de fijación de voltaje y fijación de corriente registramos neuronas aferentes vestibulares de ratas P28-P30 (n = 17) con una capacitancia de membrana promedio de 25.7 ± 2 pF y neuronas aferentes vestibulares de ratas P7-P10 días con una capacitancia de membrana promedio de 22.6 ± 1 pF (n = 31) (Tabla 1). En la figura 3.1 se muestra la distribucion de la capacitancia de membrana (Cm) de las neuronas registradas, para neuronas de ratas P28-P30 días el rango de Cm fue de 10 pF a 45 pF y para neuronas de ratas P7-P10 dias el rango fue de 10 pF a 55 pF (figura 3.1).

Tabla 1. Propiedades pasivas, resistencia de acceso, *hold* y voltaje de membrana de las NAV

Edad		P28-P30 días	P7-P10 días
n		17	31
Cm	*pF*	25.7 ± 2	22 .6 ± 1
Rm	*MΩ*	144 ± 21	285.2 ± 31
Ra	*MΩ*	3.4 ± 0.5	8 ± 0.8
τ	*μs*	99.9 ± 2	195 ± 30
Hold	*pA*	-215 ± 60	-8 ± 19
Vm	*mV*	-65 ± 1	-62 ± 1

Cm: Capacitancia de membrana, Rm: Resistencia de membrana, Ra: Resistencia de acceso, τ: Constante de tiempo, Vm: Voltaje de membrana.

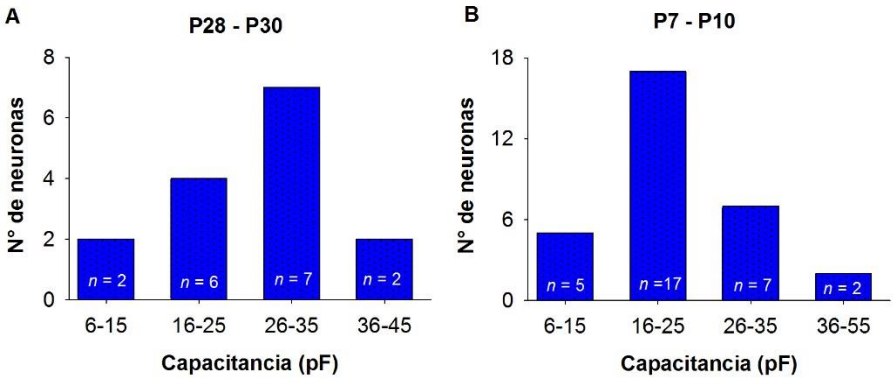


Figura. 3.1. Histograma del número de NAV vs capacitancia de membrana. A) *Grafica para NAV de ratas P28-P30 días, el rango fue de 10 pF a 45 pF y el promedio de las capacitancias fue de 25.7 ± 2 pF (n=17).* ***B)*** *Grafica para NAV de ratas P7-P10 días, el rango fue de 10 pF a 55 pF y el promedio de las capacitancias fue de 22 .6 ± 1 pF (n=31). Se observa una distribución en forma de campana en ambas edades.*

2. EVIDENCIA DE LA CORRIENTE GIRK EN CURRENT CLAMP

2.1 Evidencia de la presencia de la corriente GIRK mediante la evaluación de la descarga dinámica de PA (NAVs de ratas de 7 a 10 días)

La corriente GIRK juega un papel importante en la frecuencia de disparo de PA de diversas neuronas (Mark y cols., 2000), por lo cual para evidenciar la presencia de la corriente GIRK en las NAV decidimos producir la descarga dinámica de PA y evaluar el efecto de alcoholes y opioides.

Para producir la descarga dinámica de potenciales de acción utilizamos un protocolo de tren de 150 pulsos cuadrados (como se muestra en la Figura 2.8) Para evaluar cambio en la descarga nosotros usamos una estimulación donde aproximadamente la mitad de los pulsos cuadrados presentaron PA y el resto no presento PA y analizamos el número de potenciales de acción por ciclo en condiciones control y con la aplicación de alcoholes o con la aplicación de opioides a distintas concentraciones. Para esta serie experimental el Vm en reposo promedio fue de -62 ± 1 mV y la estimulación para producir aproximadamente un PA por cada dos pulsos fue de +/- 248.9 ± 40.5 pA (*n = 31*). La aplicación de Et-OH no modificó significativamente la descarga dinámica de PA respecto al control (30 mM, $n = 6$, $p = 0.08$; 100 mM, $n = 3$, $p = 0.9$) (Figura 3.2).

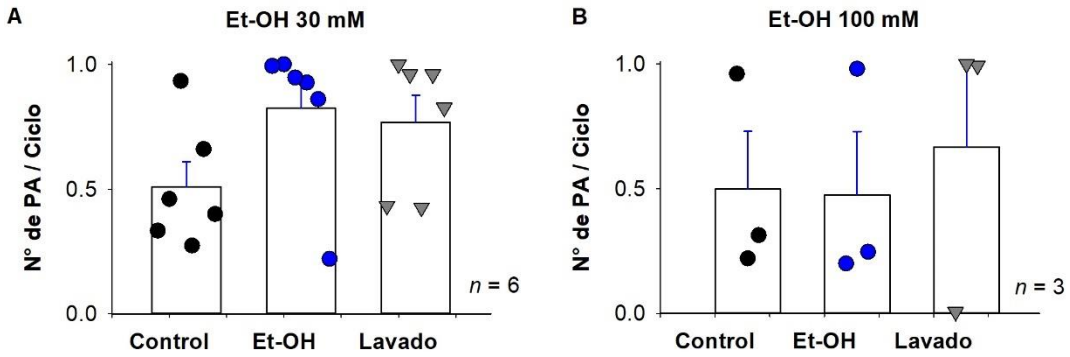


Figura 3.2. Graficas de la descarga dinámica de PA, representada como N° de PA/Ciclo. A) *La aplicación de Et-OH 30 mM no modificó la descarga dinámica de PA (n = 6, p = 0.08).* ***B)*** *La aplicación de Et-OH 100 mM no modificó la descarga dinámica de PA (n = 3, p = 0.9). En cada condición las barras representan la media con el ES. Cada punto representa el valor de una NAV, los puntos negros muestran la descarga en condiciones control, los puntos azules muestran la descarga con la aplicación de Et-OH y los puntos gises el lavado después de 1-2 minutos.*

La aplicación de Butanol no modificó significativamente la descarga dinámica de PA respecto al control (30 mM, $n = 5$, $p = 0.28$; 100 mM, $n = 4$, $p = 0.99$) (Figura 3.3).

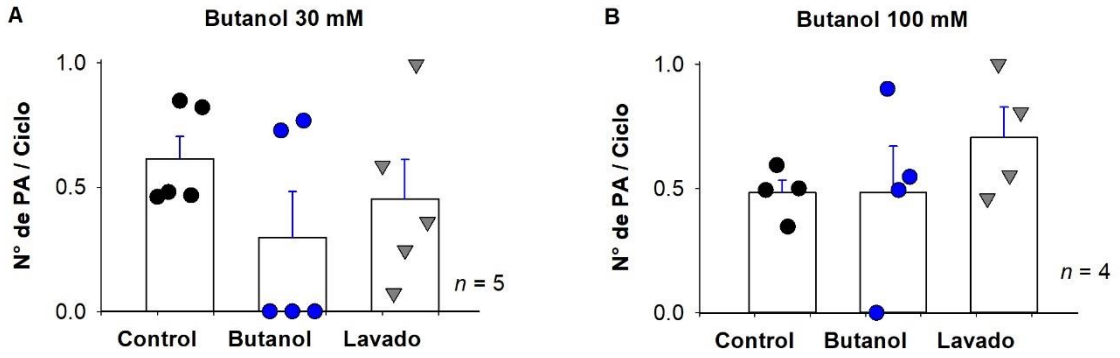


Figura 3.3. Graficas de la descarga dinámica de PA, representada como N° de PA/Ciclo. A) *La aplicación de Butanol 30 mM no modificó la descarga dinámica de PA (n = 5, p = 0.28).* ***B)*** *La aplicación de Butanol 100 mM no modificó la descarga dinámica de PA (n = 4, p = 0.99). En cada condición las barras representan la media con el ES. Cada punto representa el valor de una NAV, los puntos en negro muestran la descarga en condiciones control, los puntos color azul muestran la descarga con la aplicación de butanol y los puntos en gris el lavado después de 1-2 minutos.*

La aplicación de DAMGO no modificó significativamente la descarga dinámica de PA respecto al control (3 µM, $n = 6$, $p = 0.47$; 6 µM, $n = 8$, $p = 0.91$) (Figura 3.4).

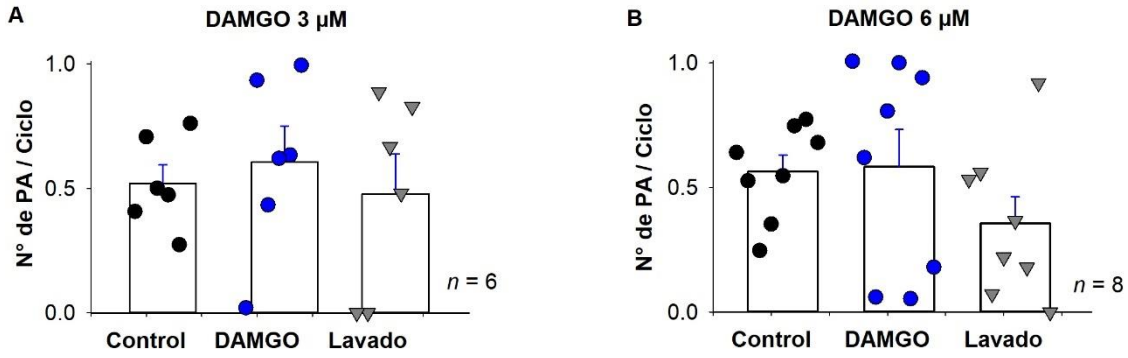


Figura 3.4. Graficas de la descarga dinámica de PA, representada como N° de PA/Ciclo. A) *La aplicación de DAMGO 3 µM no modificó la descarga dinámica de PA (n = 6, p = 0.47).* ***B)*** *La aplicación de DAMGO 6 µM no modificó la descarga dinámica de PA (n = 8, p = 0.91). En cada condición las barras representan la media con el ES. Cada punto representa el valor de una NAV, los puntos en negro muestran la descarga en condiciones control, los puntos color azul muestran la descarga con la aplicación de DAMGO y los puntos en gris el lavado después de 1-2 minutos.*

La aplicación de N / OFQ no modificó significativamente la descarga dinámica de PA respecto al control (3 µM, n = 11, p = 0.98) (Figura 3.5).

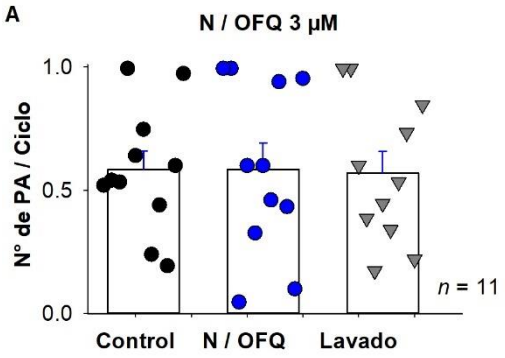


***Figura 3.5. Grafica de la descarga dinámica de PA, representada como N° de PA/Ciclo**. **A)** La aplicación de N/OFQ 3 µM no modificó la descarga dinámica de PA (n = 11, p = 0.98). Las barras representan la media con el ES. Cada punto representa el valor de una NAV, los puntos en negro muestran la descarga en condiciones control, los puntos color azul muestran la descarga con la aplicación de N/ OFQ y los puntos en gris el lavado después de 1-2 minutos.*

Los resultados anteriores sugieren que la corriente GIRK no está presente en las NAV de ratas neonatas.

2.2 Evidencia de la presencia de la corriente GIRK mediante la evaluación de la descarga dinámica de PA (NAVs de ratas de 28 a 30 días)

Dado que el sistema vestibular en las ratas no se encuentra completamente maduro hasta la cuarta semana postnatal (Jamon, 2014), a nivel funcional, las primeras descargas aferentes regulares aparecen en el aparato periférico en cuarto día postnatal (PND4) y aumentan progresivamente hasta el día 30 postnatal (PND30), decidimos hacer registros en NAV de ratas de 28 a 30 días, y en ellas evidenciar la presencia de la corriente GIRK mediante la evaluación de la descarga dinámica de PA ante la aplicación de Et-OH [30 mM], butanol [30 mM] y DAMGO [3 µM]. Para esta serie experimental el Vm en reposo promedio fue de -66 ± 09 mV y la estimulación para producir aproximadamente un PA por cada dos pulsos fue de 248.2 ± 28.1.5 pA (n = 17).

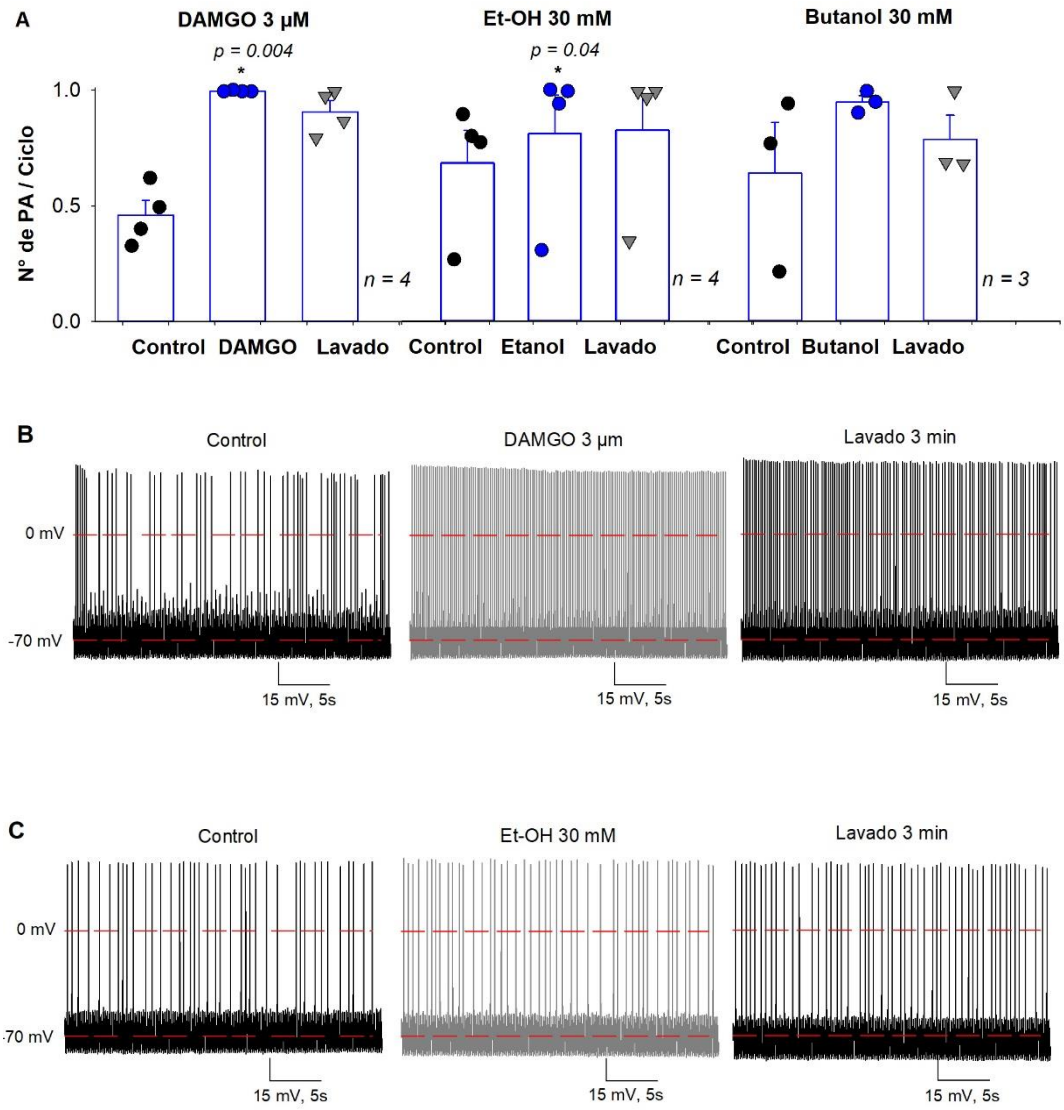


***Figura 3.6. Graficas de la descarga dinámica de PA, representada como N° de PA/Ciclo**. **A)** La aplicación de DAMGO 3 µM y Et-OH 30 mM y aumentaron significativamente la descarga dinámica de PA con respecto al control (DAMGO, p = 0.004, n = 4; Et-OH, p = 0.04, n = 4). Mientras que el aumento de la descarga con DAMGO fue del 216. 3 ± 2 %, el aumento con la aplicación de Et-OH fue del 118.5 ± 119 %. La aplicación de Butanol 30 mM no modificó la descarga dinámica de PA (n = 3, p = 0.3). En cada condición las barras representan la media con el ES. Cada punto representa el valor de una NAV, los puntos en negro muestran la descarga en condiciones control, los puntos en azul muestran la descarga con la aplicación del fármaco y los puntos en gris el lavado después de 3 minutos. **B) y C)** Trazos representativos de la descarga dinámica de los PA en las NAV, producidos con el protocolo de tren de pulsos, con aplicación de DAMGO [3 µM] y Et-OH [30 mM]. En ambas aplicaciones el lavado no recuperó la descarga control.*

La aplicación DAMGO [3 µM] aumentó la descarga dinámica de PA a un 216. 3 ± 2 % con respecto al control (n = 4, p = 0.004), el lavado de 3 minutos no recupero la descarga control, el efecto no fue reversible. La aplicación de Et-OH [30 mM] aumentó la descarga dinámica de PA a un 118.5 ± 119 % con respecto al control (n = 4, p = 0.04), el lavado no recuperó la descarga control, el efecto no fue reversible. La aplicación de Butanol [30 mM] no modificó significativamente la descarga dinámica de PA (n = 3, p = 0.3) (Figura 3.6 A). En la figura 3.6 B y C se muestran los trazos representativos de la descarga dinámica de PA en condiciones control, con aplicación de DAMGO [3 µM] y etanol [30 mM] y el lavado, mostrándose el aumento de la frecuencia de descarga de los PA y un efecto que no se recuperó a las condiciones control.

2.3. Evidenciar la presencia de la corriente GIRK mediante la medición del Vm ante pulso hiperpolarizante (NAVs de ratas de 7 a 10 días)

La corriente GIRK es una corriente entrante activada por hiperpolarización que tiende a llevar a la célula al voltaje de equilibrio del potasio, por tal motivo consideramos que en el protocolo de tren de pulsos (Figura 3.7 A), la presencia de esta corriente iónica se evidenciaría en la fase hiperpolarizante del tren de pulsos cuadros, por lo cual decidimos medir el voltaje al final del pulso hiperpolarizante (200 -201 ms) (Figura 3.7 B).

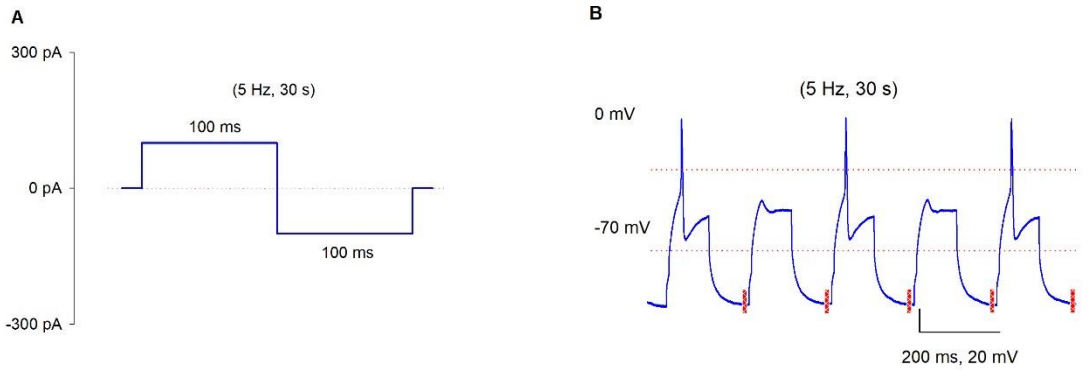


Figura 3.7. Trazo representativo para indicar el sitio de medición del Vm en la fase hiperpolarizante. A) *Protocolo de estimulación que fue en un rango de 50 pA a 300 pA* ***B)*** *Descarga dinámica de PA, los recuadros rojos indican el sitio de medición del Vm en la fase hiperpolarizante (Vmh) la región de medición fue entre de los 200 ms y 201 ms, de cada pulso. Esta medición fue graficada en las figuras 3.8, 3.9, 3.10.*

La aplicación de Et-OH no modificó el voltaje hiperpolarizante con respecto a las condiciones control (30 mM, $n = 6$, $p = 0.58$; 100 mM, $n = 3$, $p = 0.26$) (Figura 3.8).

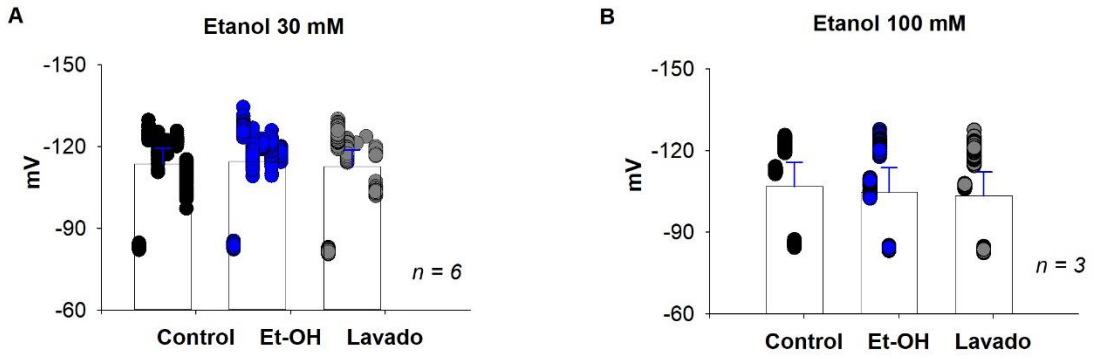


Figura 3.8. Grafica del Vm en la fase hiperpolarizante del tren de pulsos (Vmh), ante la aplicación de Et-OH. *Los círculos llenos indican el Vmh para cada célula, las barras representan el promedio con el ES. Los círculos en negro corresponden al control, los círculos en azul corresponden a la aplicación del Et-OH y los círculos en gris corresponden al lavado.* ***A) L****a aplicación de Et-OH 30 mM no modificó el Vmh con respecto al control (p = 0.58, n = 6).* ***B) L****a aplicación de Et-OH 100 mM, no modificó el Vmh con respecto al control (p = 0.26, n = 3).*

La aplicación de Butanol no modificó significativamente el pulso hiperpolarizante respecto a las condiciones control (30 mM, $n = 5$, $p = 0.14$; 100 mM, $n = 4$, $p = 0.40$) (Figura 3.9).

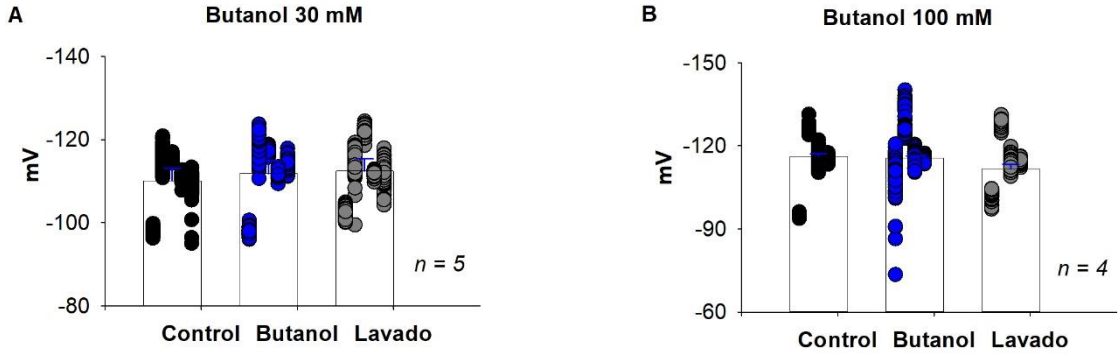


Figura 3.9. Grafica del Vmh, ante la aplicación de Butanol. *Los círculos llenos indican el Vmh para cada célula, las barras representan el promedio con el ES. Los círculos en negro corresponden al control, los círculos en azul corresponden a la aplicación del Butanol y los círculos en gris corresponden al lavado.* ***A)*** *La aplicación de Butanol 30 mM no modificó el Vmh con respecto al control (p = 0.14, n = 5).* ***B) L****a aplicación de Butanol 100 mM, no modificó el Vmh con respecto al control (p = 0.40, n = 4).*

La aplicación de los opioides DAMGO o N/OFQ no modificaron significativamente el Vmh respecto a las condiciones control (DAMGO 3 µM, *n* = 6, *p* = 0.56; DAMGO 6 µM, *n* = 8, *p* = 0.27; N /OFQ 3 µM, *n* = 11, *p* = 0.78) (Figura 3.10).

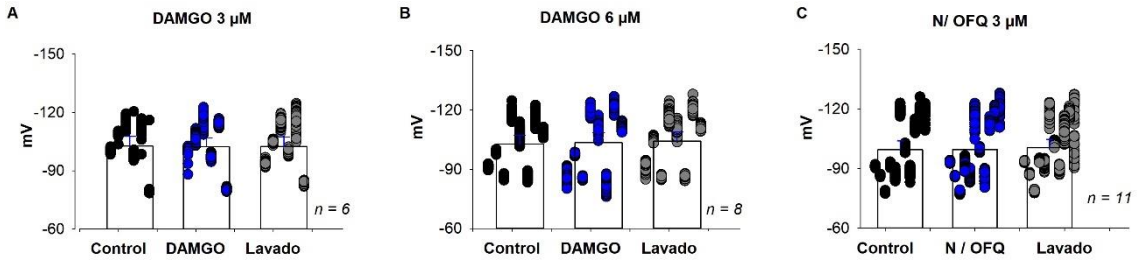


Figura 3.10. Grafica del Vmh, ante la aplicación de agonistas opioides. *Los círculos llenos indican el Vmh para cada célula, las barras representan el promedio con el ES. Los círculos en negro corresponden al control, los círculos en azul corresponden a la aplicación del agonista y los círculos en gris corresponden al lavado.* ***A) L****a aplicación de DAMGO 3 µM no modificó el Vmh con respecto al control (p = 0.56, n = 6).* ***B) L****a aplicación de DAMGO 6 µM, no modificó el Vmh con respecto al control (p = 0.27, n = 8).* ***C) L****a aplicación de N/OFQ 3 µM, no modificó el Vmh con respecto al control (p = 0.27, n = 8).*

2.4. Evidenciar la presencia de la corriente GIRK mediante la medición del Vm ante pulso hiperpolarizante (NAVs de ratas de 28 a 30 días)

También se midió el voltaje al final del pulso hiperpolarizante (200 -201 ms) (Figura 3.7 B) para las NAV de ratas P28-P30 días. La aplicación de Et-OH, Butanol y DAMGO no modificaron significativamente el Vmh respecto a las condiciones control (Et-OH 30 mM, *n* = 4, *p* = 0.32; Butanol 30 mM, *n* = 3, *p* = 0.36; DAMGO 3 µM, *n* = 4, *p* = 0.30) (Figura 3.11).

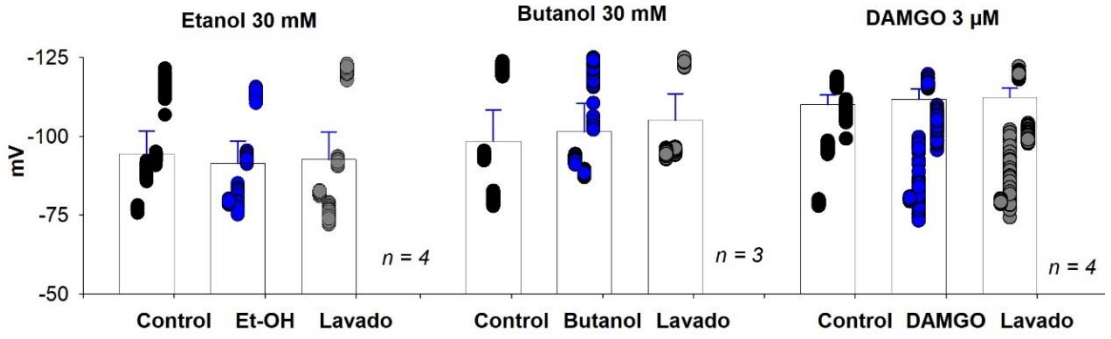


Figura 3.11. Grafica del Vmh, ante la aplicación de agonistas Et-OH, Butanol y DAMGO. *Los círculos llenos indican el Vmh para cada célula, las barras representan el promedio con el ES. Los círculos en negro corresponden al control, los círculos en azul corresponden a la aplicación del agonista y los círculos en gris corresponden al lavado.* ***A) L****a aplicación de Et-OH 30 mM no modificó el Vmh con respecto al control (p = 0.32, n = 4).* ***B) L****a aplicación de Butanol 30 mM no modificó el Vmh con respecto al control (p = 0.36, n = 3).* ***C) L****a aplicación de DAMGO 3 µM no modificó el Vmh con respecto al control (p = 0.30, n = 4).*

2.5. Análisis de las propiedades del PA ante la aplicación de DAMGO y Etanol en NAVs de ratas de P7-P10 dias

Para evaluar si la aplicación de Et-OH [30 mM] y DAMGO [3 µM] modifico las propiedades dinámicas de los potenciales de acción se analizaron las propiedades del PA en las NAV. Se evaluó la amplitud al pico, el voltaje de membrana, la tasa máxima de despolarización (TMD), la tasa máxima de repolarización (TMR), la latencia y la duración media (Figura 3.12.).

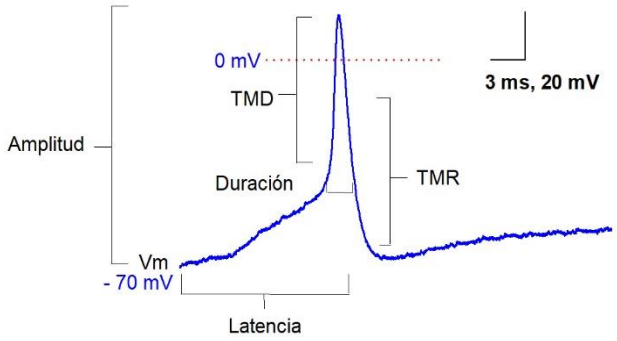


Figura 3.12. Propiedades del potencial de acción. *Se muestra un PA con sus propiedades dinámicas, amplitud, voltaje de membrana, tasa máxima de despolarización, tasa máxima de repolarización, duración media y latencia. Se consideraron PA todos aquellos donde el latigazo alcanzo los 0 mV, la duración media promedio en las NAV es ~ 2-3 ms.*

La aplicación de DAMGO [3 µM] modifico la tasa máxima de despolarización respecto a las condiciones control ($p = 0.03$, $n = 6$) (Figura 3.13.B) y el resto de los parámetros del potencial de acción no fueron modificados significativamente (Figura 3.13. A y C) en NAVs de ratas P7-P10 días.

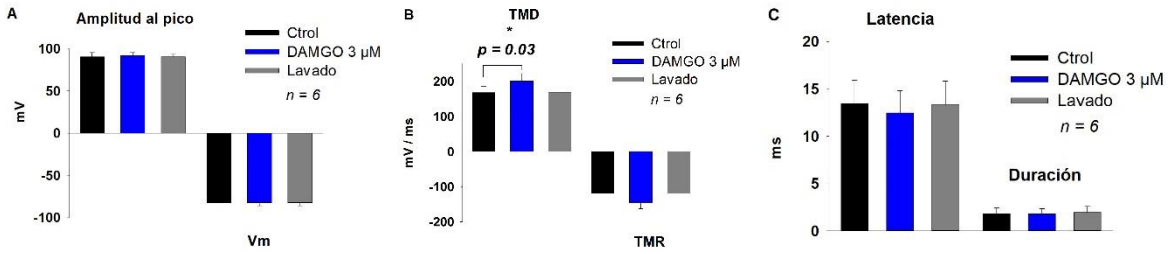


Figura 3.13. Grafica de las propiedades del PA en NAV. A) *Amplitud al pico y el voltaje de membrana no cambiaron significativamente respecto al control.* ***B)*** *La tasa máxima de despolarización aumento significativamente respecto al control (p = 0.03, n = 6) mientras la tasa máxima de repolarización no cambio significativamente.* ***C)*** *La latencia y la duración media no se modificaron respecto al control. Las barras en negro indican las condiciones control, las barras*

en azul indican la aplicación de DAMGO 3 µM y las barras en gris indican el lavado. Las barras indican el promedio con el ES para cada condición.

La aplicación de Et-OH [30 mM] aumento la tasa máxima de despolarización respecto a las condiciones control (p = 0.01, n = 5) (Figura 3.14.B), disminuyo la latencia (p = 0.04, n = 5) (Figura 3.14.C). La amplitud al pico, el voltaje de membrana, la TMR y la duración media no fueron modificados significativamente en NAVs de ratas P7-P10 días.

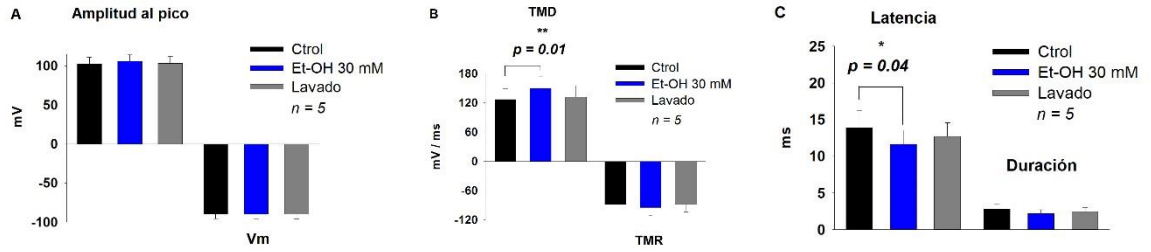


Figura 3.14. Grafica de las propiedades del PA en NAV. A) *Amplitud al pico y el voltaje de membrana no cambiaron significativamente respecto al control.* ***B)*** *La tasa máxima de despolarización aumento significativamente respecto a las condiciones control (p = 0.01, n = 5) y la tasa máxima de repolarización no cambio significativamente.* ***C)*** *La latencia disminuyo significativamente (p = 0.04, n = 5) y la duración media no se modificaron respecto al control. Las barras en negro indican las condiciones control, las barras en azul indican la aplicación de Et-OH 30 mM y las barras en gris indican el lavado. Las barras indican el promedio con el ES para cada condición.*

2.6. Análisis de las propiedades del PA con aplicación de DAMGO y Etanol en NAVs en ratas de 28-30 días

Se evaluó las propiedades del PA ante la aplicación de Et-OH [30 mM] y DAMGO [3 µM] en ratas P28-P30 días. La aplicación de DAMGO [3 µM] modifico la tasa máxima de despolarización respecto a las condiciones control (p = 0.01, n = 4) (Figura 3.15. B). Los demás parámetros del PA no fueron modificados significativamente (Figura 3.15. A y C).

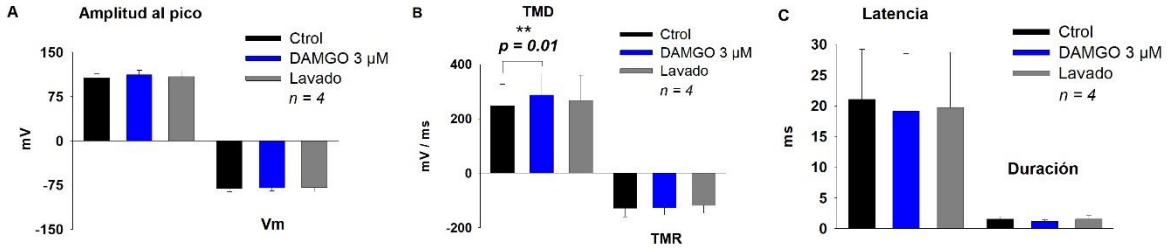


Figura 3.15. Grafica de las propiedades del PA en NAV. A) *Amplitud al pico y el voltaje de membrana no cambiaron significativamente respecto al control.* ***B)*** *La tasa máxima de despolarización aumento significativamente respecto a las condiciones control (p = 0.01, n = 4) y la tasa máxima de repolarización no cambio significativamente.* ***C)*** *La latencia y la duración media no se modificaron respecto al control. Las barras en negro indican las condiciones control, las*

barras en azul indican la aplicación de DAMGO 3 µM y las barras en gris indican el lavado. Las barras indican el promedio con el ES para cada condición.

La aplicación de Et-OH [30 mM] no modifico significativamente ninguno de los parámetros del potencial de acción en las aferentes vestibulares de ratas P28-30 días (Figura 3.16. A, B y C).

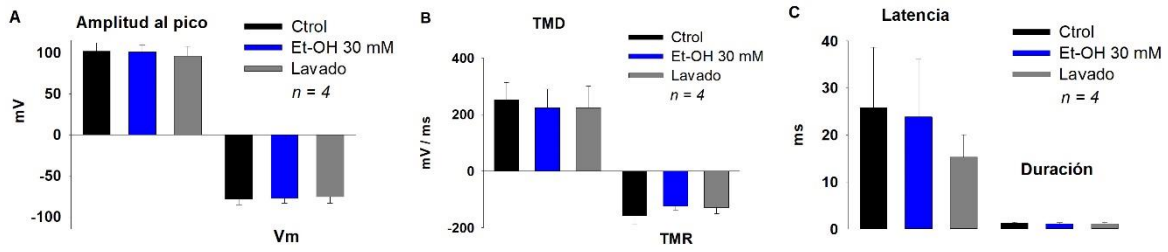


Figura 3.16. Grafica de las propiedades del PA en NAV. A) *Amplitud al pico y el voltaje de membrana no cambiaron significativamente respecto al control.* ***B)*** *Tasa máxima de despolarización y la tasa máxima de repolarización no cambio significativamente.* ***C)*** *La latencia y la duración media no se modificaron respecto al control. Las barras en negro indican las condiciones control, las barras en azul indican la aplicación de Et-OH 30 mM y las barras en gris indican el lavado. Las barras indican el promedio con el ES para cada condición.*

3. EVIDENCIA DE LA CORRIENTE GIRK EN *VOLTAGE CLAMP*

3.1. Evidencia de la corriente GIRK con alto K^+

La aplicación de solución extracelular con alto K^+ [20 mM] y [40 mM] en las NAV de ratas postnatales de 7-10 días (P7-P10 días), evidenció un aumento en la corriente rectificante entrante de K^+, donde participan los canales HCN (Almanza y cols. en el 2012) y probablemente los canales GIRK. Se observa un incremento en la corriente rectificante de entrada de potasio en el pulso hiperpolarizante de - 150 mV (Figura 3.17. A).

Los pasos de voltaje hiperpolarizante con la aplicación de solución extracelular con alto K^+ [20 mM] y solución alto K^+ [40 mM] aumentó significativamente la corriente rectificante de potasio respecto al control a partir del voltaje de -120 mV. Aumento la corriente para la solución alto K^+ [20 mM] en (125 ± 20%; 136 ± 83 %, a -130 mV y -150 mV, n = 4, p = 0.01; 0.01, respetivamente), y la solución alto K^+ [40 mM] aumento en (157 ± 70 %; 188 ± 165 a -130 mV y -150 mV, n = 4, p = 0.02; 0.02, respetivamente). El lavado recuperó la corriente a los valores control (Figura 3.17. B).

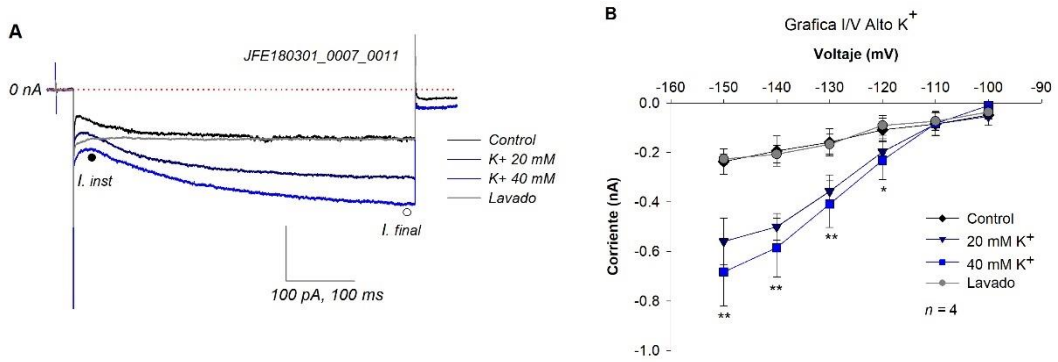


Figura 3.17. Grafica I/V de la corriente rectificante de potasio en las NAV A) *Trazo representativo del pulso hiperpolarizante a -150 mV. En negro se muestra la aplicación de solución control, en azul fuerte la aplicación de solución alto K^+ 20 mM, en azul claro la aplicación de solución alto K^+ 40 mM y en gris el lavado con solución normal.* ***B)****. Los círculos representan los promedios en cada voltaje con su ES. En negro se muestra la aplicación de solución control, en azul fuerte la aplicación de solución alto K+ 20 mM, en azul claro la aplicación de solución alto K+ 40 mM y en gris se muestra el lavado. La solución alto K^+ [20 mM] y [40 mM] aumentaron significativamente la corriente rectificante de potasio respecto al control, en el voltaje de -130 mV aumento la corriente en (125 ± 20%; 157 ± 70 %, p = 0.01; 0.02 respectivamente) y en -150 mV aumento la corriente en (136 ± 83 %; 188 ± 165, p = 0.01; 0.02 respectivamente). El cociente de la corriente final (circulo negro) menos la corriente instantánea (circulo blanco) en A (I. inst-I. final) fue graficada en B.*

El incremento en la corriente entrante de potasio fue similar cuando se perfundió solución alto K^+ [20 mM] y [40 mM] y no fueron estadísticamente diferentes para ninguno de los voltajes hiperpolarizantes (p = 0.09, en -150 mV). Los pasos de voltaje hiperpolarizante generaron una corriente entrante y mostraron dos componentes: un componente linear cuasi-instantáneo de rápida activación ($I._{inst}$) y un componente de activación lenta ($I._{final}$) (Figura 3.17.A). El cociente de la corriente final (circulo blanco) menos la corriente instantánea (circulo negro), ($I._{final}$-$I._{inst}$) fue graficada en la Figura 3.17. B.

3.2. Evidencia de la corriente GIRK por alcoholes Butanol e Isopropanol

Para evidenciar la presencia de la corriente GIRK se utilizó un protocolo en rampa con pulsos de voltaje hiperpolarizante de -150 mV a -50 mV con una duración de 500 ms (Figura 2.6) en las NAV de ratas P7-P10 días, La corriente se midió al voltaje de -140 mV (circulo negro) que fue graficada en B (Figura 3.18 A). Los pulsos pasaron cada 5 segundos, se tomaron los primeros 30 segundos control, 1 minuto aplicación de alcoholes y 30 segundos lavado.

La aplicación de Butanol [100 mM] no modifico significativamente la corriente rectificante de entrada de potasio respecto a las condiciones control (p = 0.2, n = 12) (Figura 3.18. B).

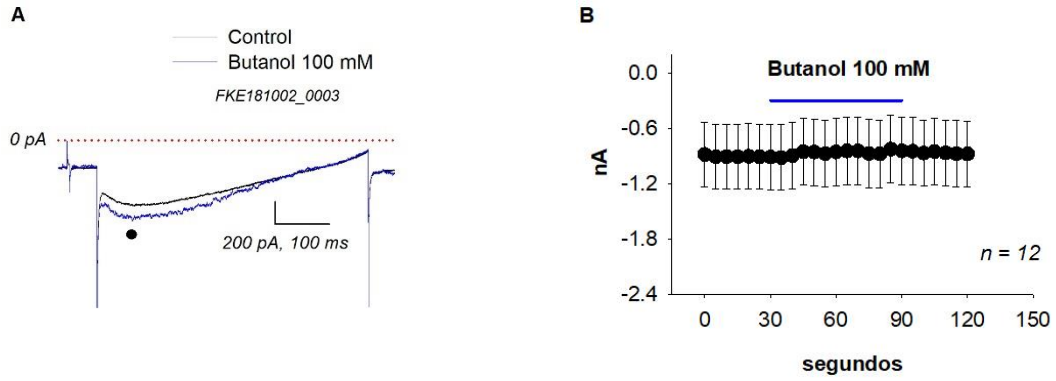


Figura 3.18. Efecto de Butanol 100 mM sobre la corriente rectificante de potasio en NAV A) *Trazo representativo del protocolo en rampa -150 mV a -50 mV, en negro condiciones control y en azul aplicación de Butanol 100 mM, El circulo negro indica el lugar donde se midió la corriente (100 ms-101ms) que fue graficado en B.* ***B)*** *Grafica de la corriente contra tiempo. Los círculos negros indican el promedio de la corriente con su ES. Los primeros 7 puntos corresponden al control, los siguientes 12 puntos corresponden a la aplicación de Butanol 100 mM y los últimos corresponden al lavado. No hay un aumento significativo en la corriente rectificante de potasio (p = 0.2, n = 12).*

La aplicación de Butanol [1 M] no modifico significativamente la corriente rectificante de potasio respecto a las condiciones control (p = 0.8, n = 5) (Figura 3.19. B).

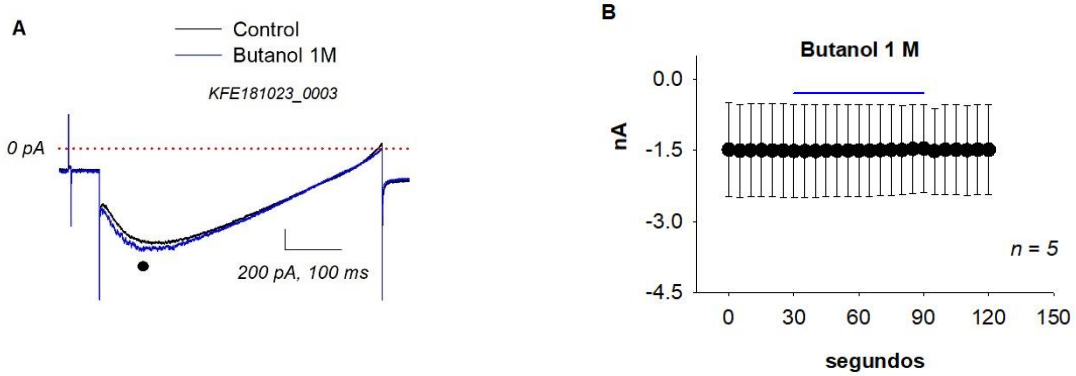


Figura 3.19. Efecto de Butanol 1 M sobre la corriente rectificante de potasio en NAV A) *Trazo representativo del protocolo en rampa -150 mV a -50 mV, en negro condiciones control y en azul aplicación de Butanol 1 M. El circulo negro indica el lugar donde se midió la corriente (100 ms-101ms) que fue graficado en B.* ***B)*** *Grafica de la corriente contra tiempo. Los círculos negros indican el promedio de la corriente con su ES. Los primeros 7 puntos corresponden al control, los siguientes 12 puntos corresponden a la aplicación de Butanol 1M y los últimos corresponden al lavado. No hay un aumento significativo en la corriente rectificante de potasio (p = 0.8, n = 5).*

La aplicación de isopropanol [100 mM] no modifico la amplitud de la corriente rectificante de potasio activada por hiperpolarización (p = 0.28, n= 9) (Figura 3.20. B).

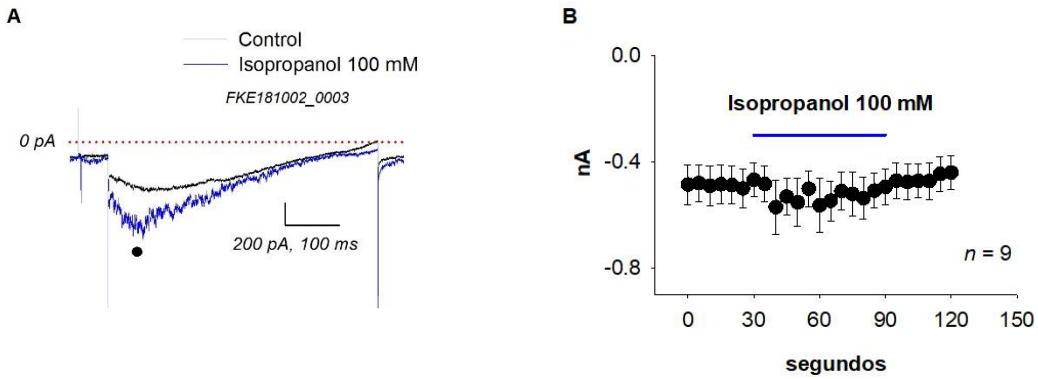


Figura 3.20. Efecto de Isopropanol 100 mM sobre la corriente rectificante de potasio en NAV A) *Trazo representativo del protocolo en rampa -150 mV a -50 mV, en negro condiciones control y en azul aplicación de Isopropanol 100 mM, El circulo negro indica el lugar donde se midió la corriente (100 ms-101ms) que fue graficado en B.* ***B)*** *Grafica de la corriente contra tiempo. Los círculos negros indican el promedio de la corriente con su ES. Los primeros 7 puntos corresponden al control, los siguientes 12 puntos corresponden a la aplicación de Isopropanol 100 mM y los últimos corresponden al lavado. No hay un aumento significativo en la corriente rectificante de potasio en el pulso hiperpolarizante (p = 0.28, n = 9).*

La aplicación de Isopropanol [1 M] modifico significativamente la amplitud de la corriente de potasio activada por voltaje hiperpolarizante entre el primer punto y el ultimo de la aplicación de Isopropanol 1 M (p = 0.02, n = 7) (Figura 3.21. B).

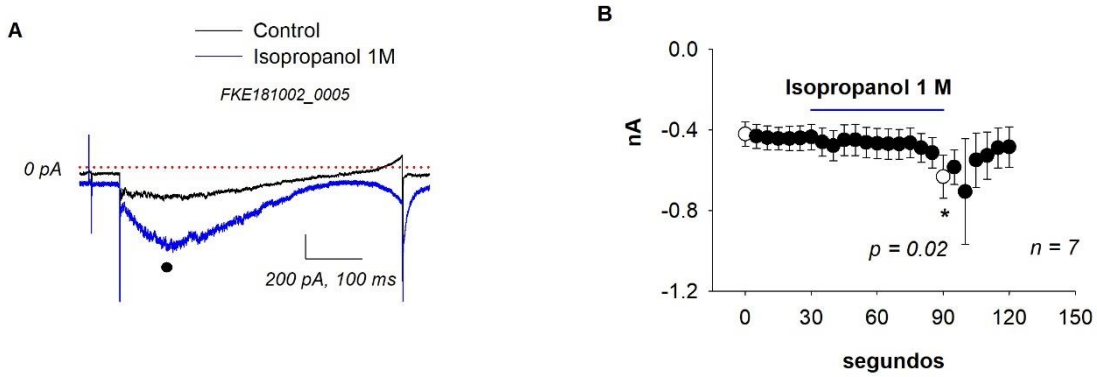


Figura 3.21. Efecto de Isopropanol 1 M sobre la corriente rectificante de potasio en NAV A) *Trazo representativo del protocolo en rampa -150 mV a -50 mV, en negro condiciones control y en azul aplicación de Isopropanol 1 M, El circulo negro indica el lugar donde se midió la corriente (100 ms-101ms) que fue graficado en B.* ***B)*** *Grafica de la corriente contra tiempo. Los círculos negros indican el promedio de la corriente con su ES. Los primeros 7 puntos corresponden al control, los siguientes 12 puntos corresponden a la aplicación de Isopropanol 1 M y los últimos corresponden al lavado. No hay un aumento significativo en la corriente rectificante de potasio (p = 0.27, n = 7).*

3.3 ML297 3µM

La aplicación de solución tyrode con buffers de fosfatos más ML297 [3µM] no modifico la corriente rectificante de entrada de K^+ respecto al control en los voltajes de -70, -90, -110 y -130 mV en las NAV de ratas jóvenes de 28 a 30 días (Figura 3.22.A). No aumento la corriente rectificante de potasio para ninguno de los voltajes hiperpolarizantes con la aplicación instantánea y de 1-2 min de solución tyrode más ML297 [3µM] (p = 0.6; 0.2 a -130 mV respectivamente) (Figura 3.22. B).

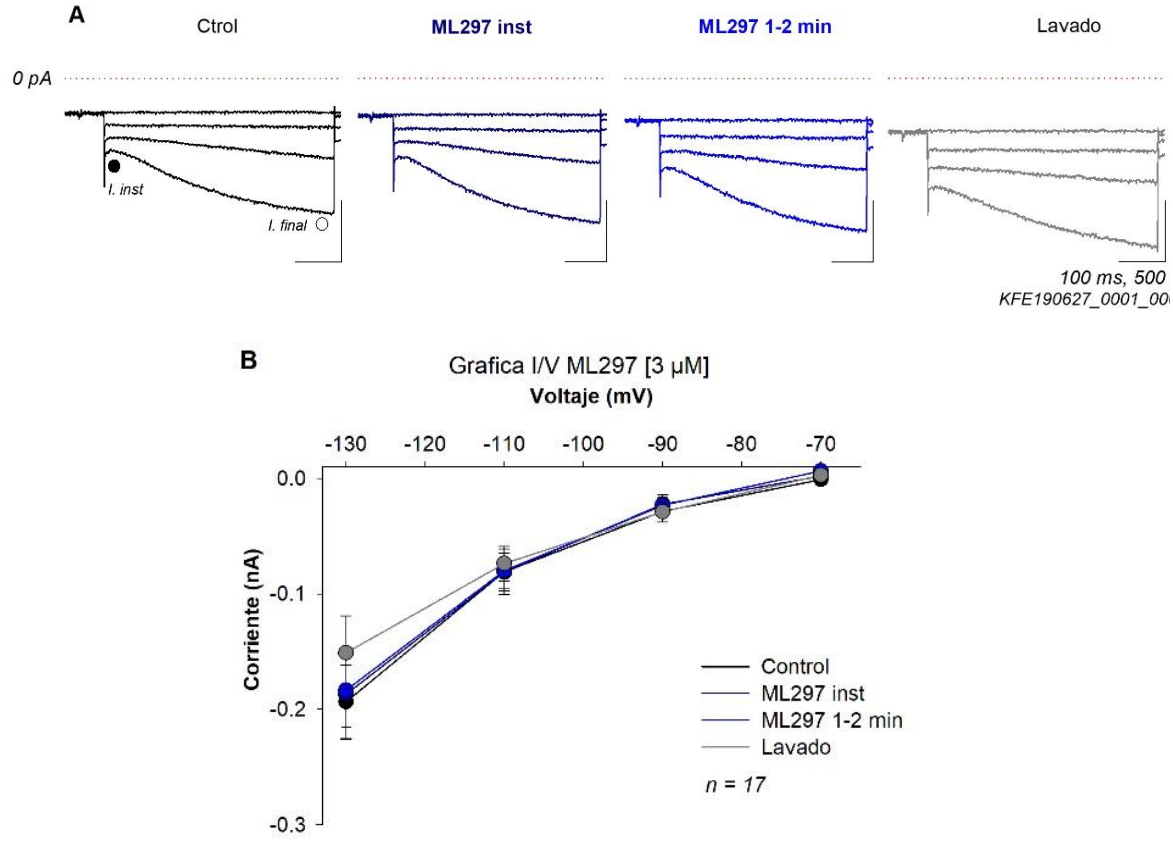


Figura 3.22. Trazo representativo y grafica I-V de ML297 3 µM. A) *Trazos representativos de protocolo de pulsos crecientes en sentido hiperpolarizantes. En negro se muestra la aplicación de solución control, en azul fuerte la aplicación inmediata de solución tyrode con ML297 [3µM], en azul claro la aplicación de solución tyrode con ML297 [3µM] por 1-2 minutos y en gris el lavado con solución tyrode normal* ***B)*** *Grafica I/V de -70mV a -130 mV de la corriente rectificante de potasio en las NAV. En negro se muestra la aplicación de solución tyrode control, en azul fuerte la aplicación inmediata de solución tyrode con ML297 a [3µM] (ML297 inst), en azul claro se muestra la aplicación de solución tyrode ML297 a [3µM] durante 1-2 min (ML297 1-2 min) y en gris se muestra el lavado. Los circulos representan los promedios con su ES para cada uno de los voltajes. La escala aplica para todos los trazos en A.*

No se observó un incremento en la corriente rectificante de entrada de potasio respecto a las condiciones control con la aplicación de ML297 [3 µM] instantánea y ML297 [3 µM] de 1-2 min. en el pulso hiperpolarizante de - 130 mV (Figura 3.23. A). Aplicación de tyrode más ML297 [3µM] no modifico la corriente rectificante de entrada de K^+ en el voltaje hiperpolarizante de -130 mV respecto a las condiciones control (n = 17, p = 0.45; 0.33 ML297 inst y ML2971-2 minutos respectivamente) (Figura 3.23. B).

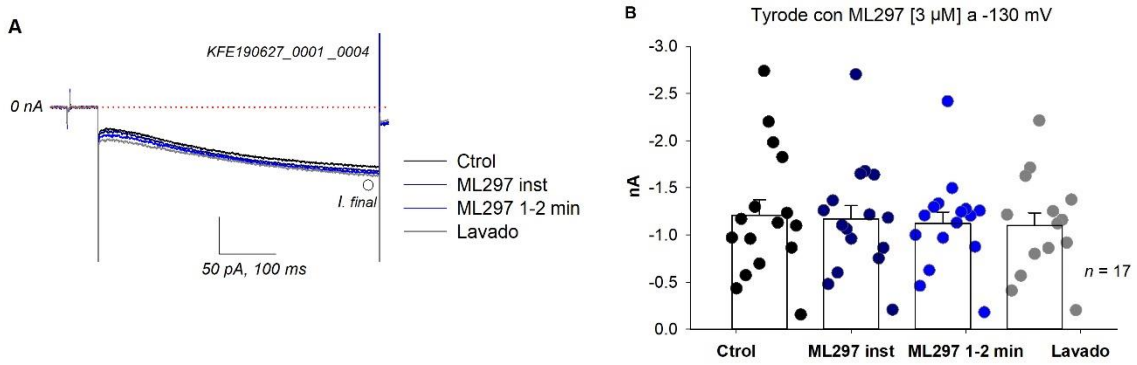


Figura 3.23. A) *Trazo representativo del pulso hiperpolarizante a -130 mV. En negro se muestra la aplicación de solución tyrode control, en azul fuerte la aplicación inmediata de solución tyrode con ML297 3µM, en azul claro la aplicación de solución tyrode con ML297 3µM por 1-2 minutos y en gris el lavado con solución tyrode normal. El circulo vacío indica la corriente medida en el ms 582-583 que fue graficado en B.* ***B)*** *Corriente medida al final de pulso hiperpolarizante de -130 mV en condiciones control, aplicación inmediata de tyrode con ML297 [3µM] (ML297 inst), aplicación de tyrode con ML297 [3µM] por 1-2 minutos (ML297 1-2 min) y Lavado. Los círculos llenos indican la medición en cada pulso hiperpolarizante, y las barras representan el promedio con el error estándar.*

La aplicación de ML297 [3µM] no modifico la corriente rectificante de entrada de K^+ en el voltaje hiperpolarizante de -130 en ninguna de las células (Figura 3.24).

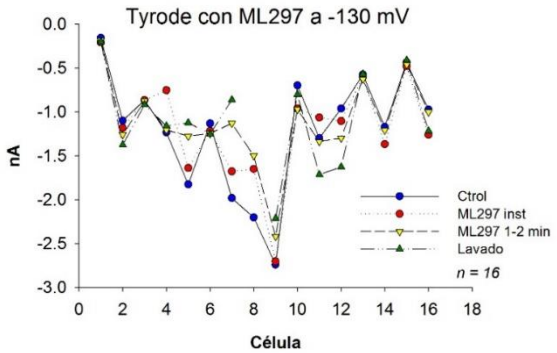


Figura 3.24. *Grafica de puntos que representa cada una de las células en cada unan de las condiciones, Control, ML297 aplicación inmediata, ML297 aplicación 1-2 minutos y Lavado al pulso hiperpolarizante de -130mV. No hay cambios significativos durante la aplicación de ML297 respecto a las condiciones control de la corriente rectificante de potasio.*

DISCUSIÓN

Los canales rectificantes de entrada acoplados a proteínas G, son importantes para la señalización neuronal y la excitabilidad de la membrana. Estudios anteriores han demostrado que el ARNm de GIRK1–4 se distribuyen claramente en cerebros de ratas. Xiao-fei *et al.* pudo demostrar la presencia de esta corriente en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (GRD) de rata adulta, por medio de la técnica de RT-PCR detecto la presencia de las 4 subunidades GIRK1-4 y por medio de registros electrofisiológicos de *Patch Clamp* en la modalidad de célula confirmó que los canales GIRK están expresados y funcionalmente acoplados a receptores $GABA_B$ mediado por baclofen, un agonista para este receptor. Wydeven *et al* reporto, que en neuronas cultivadas del hipocampo de la región CA1 (grandes células piramidales), que expresan GIRK1–3, el agonista GIRK, ML297 evoca una corriente interna dependiente de la concentración a una EC_{50} de (377 ± 70 nM). ML297 activo los canales GIRK a través de un mecanismo único que requiere dos aminoácidos específicos de la subunidad GIRK1.

El modelo clásico de activación de los canales GIRK implica la activación inducida por el receptor de proteínas G i / o, lo que facilita una interacción entre el canal y Gβγ. La evidencia sostiene que la activación inducida por ML297 de los canales GIRK difiere mecánicamente de este modo de activación del canal. Primero, la activación de ML297 de los canales que contienen GIRK1 no se ve afectada por la toxina pertussis, que impide la activación inducida por el receptor de proteínas G i / o. En segundo lugar, la activación inducida por el receptor de los canales GIRK está impedida por la sobreexpresión de un eliminador de Gβγ (GRK3ct), un carroñero que puede unirse a dímeros de Gβγ libres e inhibir la señalización dependiente de Gβγ, mientras que la activación del canal inducido por ML297 no se altera. Tercero, ML297 activa selectivamente los canales que contienen GIRK1, mientras que Gβγ activa tanto los canales que contienen GIRK1 como los que carecen de GIRK1 (Wydeven y cols., 2014). Todo esto nos lleva a pensar que la subunidad GIRK1 no se expresa, al menos no funcionalmente en las NAV.

CONCLUSIÓN

Hay evidencia que nos indica que las NAV expresan la corriente GIRK. Pero falta evidencia contundente que nos defina su presencia en estas neuronas, conocer la expresión de las subunidades por la técnica de RT-PCR nos ayudara a comprender mejor la posible composición de los canales GIRK y función. Las neuronas aferentes vestibulares no aumentaron la corriente entrante ante el pulso hiperpolarizante con el agonista ML297 que es selectivo para los canales que presentan la subunidad GIRK1, por lo que concluimos que no está presente la subunidad GIRK1 en las NAV.

REFERENCIAS

Almanza, A. et al. (2012). Molecular identity, ontogeny, and cAMP modulation of the hiperpolarización active current in the vestibular ganglion neurons. *J Neurophysiology*, 108: 2264-2275.

Cortes, C. (2013). Fundamentos fisiológicos del sistema vestibular. En Barret, K. Barman, S. M., Boitan, S. y Brooks H. (Ed.) *Ganong. Fisiología médica* (pp. 1-3). Mexico, DF. McGraw-Hill/Interamericana.

Cullen, K.E. (2011). The vestibular system: multimodal integration and encoding of self-motion for motor control. *Cell Press, 30* (10), 1-12. Doi: 10.1016/j.tins.2011.12.001.

Cullen, K.E. (2019). Vestibular processing during natural self-motion: implications for perception and action. *Nature Reviews, Neurocience.* DOI: https://doi.org/10.1038/s41583-019-0153-1.

Vidal, P. P., Cullen, K., Curthoys, I. S., Du Lac, S., Holstein, G., *et al.* (2015). The Vestibular System. In *The Rat Nervous System: Fourth Edition* (pp. 805-864). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00028-0

Curthoys, I. (1979). The development of function of horizontal semicircular canal primary neurons in the rat. *Brain Research*, 41-52.

Fettiplace, R. (2017). Hair Cell Transduction, Tuning, and Synaptic Transmission in the Mammalian Cochlea. *COMPREHENSIVE PHYSIOLOGY*, 1197-1227.

Flores, AR., Galicia, S., Gómez G. (2001). El sistema vestibular: aspectos generales y neurodesarrollo. En: Velázquez, J. (Ed.) Temas Selectos de Neurociencias II. (pp. 179-208). UAM-PUIS, México.

García, J., Aviñoa, A., y Arjona, C. (2001) Capítulo 4, Fisiología del sistema vestibular. En SEORL PCF. (Ed.) *Libro virtual de formación en Otorrinolaringología.* (pp. 1-14).

Goldberg, J. y Fernández, C. (1980). Efferent Vestubular System in the Squirrel Monkey: Anatomical Location and Influence on Afferent Activity. *Journal of Neurophysiology*. *43*(4): 986-1025.

Huang, Y., Zhang, Y., Kong, S., Zang, K., Jiang, S. *et al.* (2018). GIRK1-mediated inwardly rectifying potassium current suppresses the epileptiform burst activities and the potential antiepileptic effect of the ML297. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.114.

Ikeda, K., et al. (2002). Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys?, *Neuroscience Research*, 44 (*2*), 121-131. doi: 10.1016 / s0168-0102 (02) 00094-9.

Jamon, M. (2014). The development of the vestibular system and related functions in mammals: impact of gravity. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. *11* (8): 1-13. doi: 10.3389/fnint.2014.00011.

Kaufman, K., Romaine, I., Days, E., Pascual, C., Malik, A., Y., *et al.* (2013). ML297 (VU04556810), the Firs Potent and Selective Activator of the GIRK Potassium Channel, Displays Antiepileptic Properties in Mice. *ACS Chem. Neurosci.* 4: 1278-1286. Dx doi.org/10.1021/cn400062a.

Khan, S. y Chang, R. (2013). Anatomy of the vestibular system: A review, Review Article. *NeuroRehabilitation*, 32 (2013) 437-443. DOI 10.3233/VES-130494.

Kobayashi, T., Ikeda. K.,Kojima, H., Yano, R., Yoshioka, Yoshioka, T., Kumanishi, T. (1999). Ethanol opens G-protrin activated inwardly rectifying K+ channels. *Nature neuroscience. 12* (2): 1091-1097.

Kofuji, P., Davison, N., y Lester, H. A. (1995). Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K^+. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 6542-6546.

Kunkel, M. T., y Peralta, E. G. (1995). Identification of Domains Conferring G Protein Regulation on Inward Rectifier Potassium Channels. *Cell Pres.* 83. 443-449.

Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat. F., Heurteaux. C., *et al.* (1995). Molecular Properties of Neuronal G-protein-activated Inwardly Rectifying K+ Channels. *The Journal of Biological Chemistry.* 48 (270): 28660-28667.

Lewohl, L. et al. (1999). G-protein-couple inwardly rectifying potassium channels are tarets of alcohol action. *Nature neurocience.* 12 (2), 1084-1090.

Marcotti, W. y Masetto, S. (2010) Hair Cells. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000181.pub2

Mark, M. D. y Herlitze, S. (2000). G-protein mediated inward-rectifier K+ channels. *Eur. J. Biochem.* 267, 5830-5836.

Mathews, M. A., Camp, A. J. y Murray, A. J. (2017). Reviewing the Role of the Efferent Vestibular System in Motor and Vestibular Circuits. Front. Physiol. 8:552. doi: 10.3389/fphys.2017.00552

Nagi, K., y Pyneiro, G. (2014). Kir3 channel signaling complexes: focus on opioid receptor signaling. *Frontiers in Cellular Nueroscience.* 186 (8): 1-15. DOI: 10.3389/fncel.2014.00186.

Sanchez, I. et al. (2017). Activation of G-protein-gated inwardly rectifying potassium (Kir3/GirK) channels rescues hippocampal functions in a mouse model of early amyloid-β pathology. *Nature Scientific reports. 7*: 14658. DOI: 10.1038 / s41598-017-15306-8.

Seseña, E., Vega, R., y Soto, E. (2014). Activation of μ-opioid receptors inhibits calcium-currents in the vestibular afferent neurons of the rat through a cAMP dependent mechanism. *Frontiers in Cellular Nueroscience.* 90(8): 1-15. DOI: 10.3389/fncel.2014.0090.

Solís, H., Lopez-Hernandez, E. y Cortés-Gasca, D. (2008). La excitabilidad neuronal y los canales de potasio, *Arch Neurocien (Mex), 13*(3): 195-201.

Soto, E. y Vega, R. (1988). Actions of excitatory amino acid agonists and antagonists on the primary afferents of the vestibular system of the axolotl (Ambystoma mexicanum). *Brain Research*, 462: 1114- I 11.

Soto, E. y Vega, R. (2010). Neuropharmacology of Vestibular System Disorders. *Current Neuropharmacology, 8*, 26-40.

Soto, E., Limón, A., Ortega, A. y Vega, R. (2002). Características morfológicas y electrofisiológicas de las neuronas del ganglio vestibular en cultivo. *Gaceta Médica de México Vol. 138*(1).

Soto, E., Vega, R. y Seseña E. (2013). Neuropharmacological basis of vestibular system disorder treatment. *Journal of Vestibular Research*, 119–137. DOI 10.3233/VES-130494.
Wickman, K. D., y Clapham D. E., (1995). G-protein regulation of ion channels. *Current Biology*. 5: 278-285.

Vega, R., and Soto, E. (2003). Opioid receptors mediate a postsynaptic facilitation and a presynaptic inhibition at the afferent synapse of axolotl vestibular hair cells. Neuroscience 118, 75–85. doi: 10.1016/S0306-4522(02) 00971-5

Wydeven, N., et al. (2014) Mechanisms underlying the activation of G-protein–gated inwardly rectifying K+ (GIRK) channels by the novel anxiolytic drug, ML297. *PNAS*, *111*(29), 10755–10760.

Xiao-Fei, G., Hia-lin, Z., Zhen-dong, Y., Chang-lin, L. y Cheng, HE. (2007). G protein-copupled inwardly retifying potassium channels in dorsal root ganglion neurons. *Acta Pharmacol. Sin.* 28 (2): 185-190.