



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CORRIENTE DE  $K^+$   
RECTIFICANTE DE ENTRADA ACOPLADA A PROTEÍNAS G  
(GIRK) Y SU MODULACIÓN POR ALCOHOLES Y PÉPTIDOS  
OPIOIDES EN NEURONAS AFERENTES VESTIBULARES.

Tesis presentada para obtener el grado de:  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:  
KATYA MARIANA ROSAS RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS Y ASESOR METODOLÓGICO:  
D.C. EMMANUEL SESEÑA MÉNDEZ

ASESORES DE TESIS:  
M. C. Montserrat Vázquez Balbuena  
D. C. Salvador Galicia Isasmendi



FEBRERO 2020

## Dedicatoria

Cuando me preguntan "¿Quiénes son tus ídolos?", les contestó "¡Son mis padres!". Por las enseñanzas y por los momentos gratos que le han brindado a mi ser, lo que agradezco y valoro, para ellos, este trabajo. Los amo.

Para mi hermano, mi mayor ejemplo, al que le debo mucho de lo que he aprendido pues lucha la vida a mi lado. Te amo hermano.

Y para mis abuelos: Eulalia, Zenaida y Ángel, que a través del tiempo me han apoyado e inspirado.

## Agradecimientos

"El maestro mediocre, dice. El buen maestro, explica. El maestro superior, demuestra. El gran maestro, inspira" (William Arthur Ward). Para el Dr. Emmanuel Seseña Méndez, gracias por inspirarme, por confiar en mis posibilidades y por su infinita paciencia.

Para el Dr. Enrique Soto y la Dra. Rosario Vega, ha sido un verdadero placer trabajar en su laboratorio. Gracias por la oportunidad.

Para Francisco y Jesua, trabajar con ustedes ha sido una de las mejores experiencias de mi vida. Gracias por tratarme bien y darme siempre su ayuda.

Para Magaly, gracias por darme eso que necesitaba en el momento. Te quiero.

Para David, gracias por alegrar mi estadía en la universidad y por lograr que creyera en mí.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
A. EL SISTEMA VESTIBULAR .....	1
Estructura .....	1
Excitabilidad de las NAV .....	5
Canales iónicos voltaje dependientes en las NAV.....	6
B. ENFERMEDADES DEL SISTEMA VESTIBULAR.....	9
<b>ANTECEDENTES</b> .....	10
A. FAMILIA DE LOS CANALES DE K <sup>+</sup> RECTIFICANTES DE ENTRADA (K <sub>ir</sub> ) .....	10
B. CANALES DE K <sup>+</sup> RECTIFICANTES DE ENTRADA ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GIRK) .....	10
Modulación de los canales GIRK por opioides .....	15
Modulación de los canales GIRK por alcoholes.....	16
C. EL ALCOHOL Y SUS EFECTOS EN EL ORGANISMO.....	18
El alcohol y su efecto sobre el sistema vestibular.....	19
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	21
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	21
<b>HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	22
<b>OBJETIVOS</b> .....	23
General .....	23
Específicos .....	23
<b>METODOLOGÍA</b> .....	24
Bioética.....	24
Cultivo primario de NAV.....	25
Soluciones y fármacos para el registro electrofisiológico .....	27

Registro electrofisiológico .....	27
Protocolos de registro .....	28
Análisis de datos .....	31
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
1. Propiedades pasivas de las NAV.....	34
2. Evidencia de la corriente GIRK en NAV, con protocolos de fijación de voltaje.....	35
3. Evidencia de la corriente GIRK en las NAV mediante la aplicación de alcoholes y del opioide en el protocolo de <i>tren de pulsos</i> para la descarga dinámica del PA.....	42
4. Medición del voltaje de membrana en la fase hiperpolarizante del <i>tren de pulsos</i> como evidencia de la corriente GIRK en NAV. ....	43
5. Análisis de los parámetros del PA ante la aplicación de los tratamientos. ....	45
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>48</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>53</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>54</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>62</b>

## RESUMEN

Las áreas sensoriales del sistema vestibular contienen células receptoras, células de soporte y terminales nerviosas de tipo aferente y eferente (Binetti, 2015; Purves, *et al.*, 2012). Las neuronas aferentes vestibulares (NAV) se clasifican con base en la regularidad de su descarga eléctrica en regulares e irregulares, lo cual está correlacionado con su ubicación en el neuroepitelio sensorial, así como por las características intrínsecas de las neuronas como son su forma y los canales iónicos que poseen (Soto, Limón, Ortega y Vega, 2002; Eatock, Xue y Kalluri, 2008; Eatock y Songer, 2011; Vaamonde, 2001). Los canales de K<sup>+</sup> rectificantes de entrada acoplados a proteínas G (GIRK) son canales iónicos activados por proteínas G capaces de modular el patrón de descarga de potenciales de acción en diversas neuronas (Hibino, *et al.*, 2010), se ha demostrado que estos canales pueden ser modulados por la activación de receptores a opioides y por alcoholes (Hibino, *et al.*, 2010; Kobayashi, *et al.*, 1999; Kaufmann, *et al.*, 2013; Lewohl, *et al.*, 1999).

Por las características eléctricas de las NAV (Soto, Vega y Seseña, 2013) y por sus receptores acoplados a proteínas G (Seseña, 2009; Seseña, Vega y Soto, 2014), es factible que los canales GIRK se encuentran en ellas, influyendo de esta manera en sus patrones de descarga. Determinar la presencia de los canales GIRK en las NAV aportará información sobre las características intrínsecas de descarga de estas neuronas. Para evidenciar la presencia de la corriente GIRK realizamos registros electrofisiológicos de NAV en cultivo primario de ratas *Long Evans* (neonatos de 7-10 días y 28-30 días), mediante la técnica *Patch Clamp* en célula completa, ante la aplicación de alcoholes: etanol [30 mM, 200 mM y 500 mM], butanol [30 mM, 100 mM y 1 M], isopropanol [100 mM y 1 M], y del agonista opioide [D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol] –encefalina (DAMGO) [3 μM].

Los resultados de fijación de voltaje indicaron que en las NAV con soluciones altas en K<sup>+</sup> se presenta la corriente entrante activada por hiperpolarización a partir del voltaje de -120 mV (K<sup>+</sup> [20 mM],  $p = 0.03$ ), para -130 mV (K<sup>+</sup> [20 mM],  $p = 0.01$ ; K<sup>+</sup> [40 mM],  $p = 0.02$ ), para -140 mV (K<sup>+</sup> [20 mM],  $p = 0.0004$ ; K<sup>+</sup> [40 mM],  $p = 0.01$ ) y

para -150 mV ( $K^+$  [20 mM],  $p = 0.01$ ;  $K^+$  [40 mM],  $p = 0.02$ ). La aplicación de isopropanol [1 M] aumentó en  $59 \pm 29 \%$  la corriente activada por hiperpolarización ( $n = 8$ ,  $p = 0.05$ ), indicando la presencia de los canales GIRK. El uso del agonista selectivo de los canales GIRK ML297 [3  $\mu$ M] no modificó la corriente iónica, indicando la ausencia de los heterómeros GIRK1/4 y GIRK1/2 en las NAV, sin descartar la posible presencia de canales formados por la combinación del resto de las subunidades (Lewohl, *et al.*, 1999; Gao, Zhang, You, Lu y He, 2007; Mark y Herlitze, 2000). Mediante la técnica de fijación de corriente encontramos que etanol [30 mM] y DAMGO [3  $\mu$ M] aumentaron la descarga dinámica del potencial de acción (PA) en  $28 \pm 26 \%$  ( $p = 0.03$ ) y  $82 \pm 36\%$  ( $p = 0.03$ ), respectivamente. En el PA etanol disminuyó la latencia al pico en  $1.87 \pm 5.88 \%$  ( $p = 0.02$ ), mientras que DAMGO aumentó la amplitud del PA en  $3.35 \pm 6.41 \%$  ( $p = 0.01$ ), y la tasa máxima de despolarización (TMD) del PA en  $7.14 \pm 21 \%$  ( $p = 0.02$ ), ambos sin modificar el resto de los parámetros del PA.

Nuestros resultados sugieren la presencia de la corriente GIRK en las NAV, pero no pudimos demostrarlo contundentemente. Resultados como el aumento de la corriente activada por hiperpolarización ante la aplicación de isopropanol [1 mM] y el aumento en la frecuencia de descarga ante la aplicación de etanol y DAMGO son consistentes con la presencia de la corriente GIRK; sin embargo, la falta de efecto ante la aplicación del agonista ML297 y la falta de cambio en el  $V_m$  hiperpolarizante en el tren de pulso ante la aplicación de alcoholes y opioides, también sugieren que la corriente no está presente.

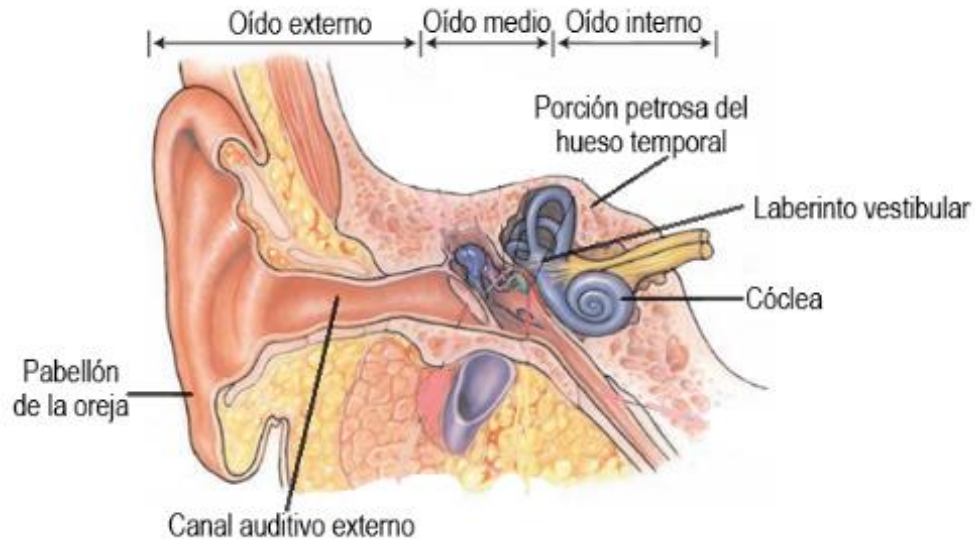
## INTRODUCCIÓN

### A. EL SISTEMA VESTIBULAR

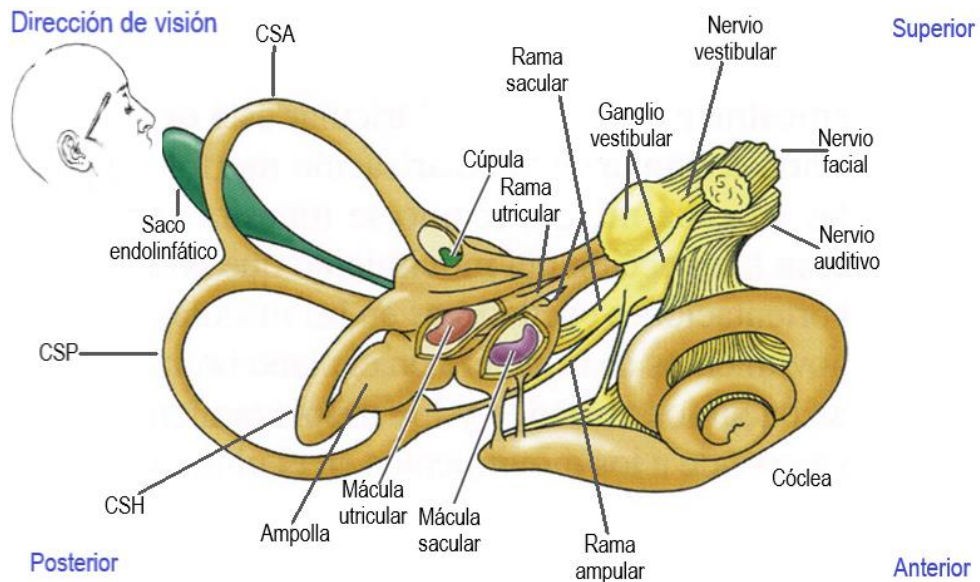
El sistema vestibular es un sistema sensorial que sensa las aceleraciones de nuestra cabeza, esta información es integrada a nivel central, donde aunada con la información propioceptiva y visual, participa en estabilizar la mirada, modificar el tono muscular para mantener el equilibrio, la percepción del espacio personal, peripersonal y en la navegación espacial (Purves *et al.*, 2012; Siegel y Sapru, 2015; Flores, Galicia y Gómez, 2001).

#### Estructura

El vestíbulo es el componente periférico del sistema vestibular, se localiza en el oído interno contenido en la porción petrosa del hueso temporal. El vestíbulo contiene un conjunto de cámaras membranosas interconectadas llamadas *el laberinto* vestibular, que constituye un sistema de balance (*figura 1*). *El laberinto* se compone de dos órganos otolíticos, el utrículo y el sáculo, y tres canales semicirculares de aproximadamente 2/3 de círculo (*figura 1.1*) (Purves *et al.*, 2012). Los órganos otolíticos responden fundamentalmente a aceleraciones lineales de la cabeza, mientras que los canales semicirculares se disponen en los tres planos espaciales, lo que les permite sensar aceleraciones angulares particulares de la cabeza (*figura 1.2*) (Binetti, 2015; Purves *et al.*, 2012). El laberinto membranoso se encuentra lleno de endolinfa y el exterior es bañado por la perilinfa. Las áreas sensoriales en los órganos otolíticos se denominan máculas, mientras que en los canales semicirculares se denominan ámpulas (*figura 1.1*). Las áreas sensoriales contienen células receptoras (células ciliadas vestibulares tipo I y II), además de terminales nerviosas de tipo aferente y eferente (Binetti, 2015; Flores *et al.*, 2001; Purves *et al.*, 2012).

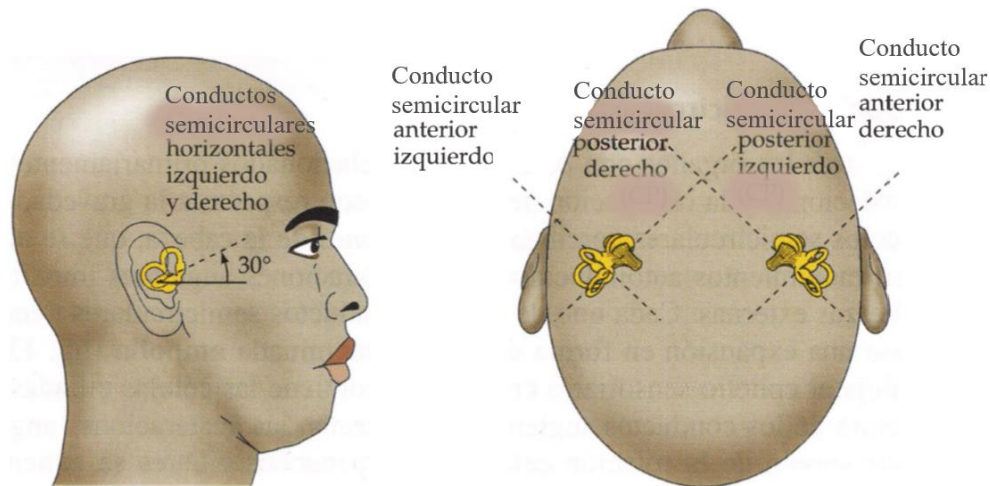


**Figura 1. Anatomía del oído.** El oído tiene tres divisiones: oído externo, medio e interno. Dentro del oído interno se encuentra el laberinto vestibular (Modificado de Siegel y Sapru, 2015).



**Figura 1.1. Estructuras del laberinto vestibular y su inervación aferente.** Se observa la localización de los órganos otolíticos con la orientación de la mácula y la localización de los conductos semicirculares con la orientación de la cúpula. Además se observa la inervación aferente a través de ramas que provienen del ganglio vestibular. CSA, conducto semicircular anterior; CSP, conducto semicircular posterior; CSH, conducto semicircular horizontal. (Modificado de Purves *et al.*, 2012; Vaamonde, 2001).





**Figura 1.2. Orientación espacial de los conductos semicirculares.** En cada lado de la cabeza hay un laberinto vestibular con los conductos semicirculares dispuestos en planos paralelos. Los conductos anterior y posterior se encuentran orientados ortogonalmente y el conducto horizontal se encuentra orientado a 30°. La mácula del utrículo se encuentra en el plano horizontal y la mácula de sáculo en el vertical (Purves *et al.*, 2012; Bear, 2016).

La célula ciliada vestibular tipo I tiene forma de botella de cuello angosto. Su polo basal está rodeado por una terminación nerviosa aferente primaria en forma de cáliz que en ocasiones puede envolver a dos o más células a la vez, en estas terminaciones aferentes se forman las conexiones sinápticas con las terminales eferentes. La célula ciliada vestibular tipo II tienen forma cilíndrica, su superficie basal contacta directamente con terminaciones nerviosas aferentes y eferentes en forma de botón, mientras que las terminaciones de las NAV dimórficas inervan ambos tipos de células ciliadas vestibulares (*figura 1.3*). Las células ciliadas varían entre las especies animales, en peces y anfibios se encuentran células ciliadas de tipo II, en reptiles se encuentran las células ciliadas de tipo I y en mamíferos se encuentran células ciliadas tipo I y II (Vaamonde, 2001; Flores *et al.*, 2001).

Las células ciliadas vestibulares tienen una polarización funcional, cuando los cilios se desplazan en una dirección aumenta la liberación del neurotransmisor glutamato y cuando se desplazan en el sentido contrario disminuye la liberación del neurotransmisor, esto se debe a la apertura y cierre de canales iónicos mecanotransductores y a un sistema de conexiones extracelulares en las que destacan los *tip links* que unen los

canales iónicos mecanotransductores de la región apical con los que se localizan en la pared lateral del siguiente cilio (*figura 1.4*) (Almanza, 2001; Vollrath, Kwan y Corey, 2007).

Las células ciliadas generan un potencial receptor que permite la liberación de neurotransmisor de manera tónica hacia las NAV, estableciendo una sinapsis que a su vez reciben inervaciones del sistema neuronal eferente (*figura 1.3*) (Binetti, 2015; Flores *et al.*, 2001).

Las NAV son neuronas bipolares cuyo soma se localiza en el ganglio vestibular, su dendrita es dirigida hacia las células ciliadas y su axón se dirige principalmente hacia los núcleos vestibulares o directamente con neuronas del cerebelo. La parte superior del ganglio vestibular inerva la cresta ampular de los canales semicirculares superior y horizontal, y la mácula del utrículo, mientras que la parte inferior inerva la cresta ampular del canal posterior y la mácula del sáculo (*figura 1.1*) (Binetti, 2015). Con base en la regularidad de su descarga eléctrica las NAV se clasifican en regulares e irregulares (Eatock *et al.*, 2008; Eatock y Songer, 2011). Las NAV irregulares tienen axones gruesos que inervan el centro de las crestas ampulares y las zonas estriolares de las máculas mediante terminaciones en cáliz o dimórficas con las células ciliadas, tienen dinámicas de alta frecuencia y de mayor variación que indican una respuesta a la velocidad cupular y al desplazamiento de la otoconia, con alta respuesta a la estimulación de las fibras eferentes. Las NAV regulares tienen axones medianos y delgados, inervan las zonas periféricas de las crestas ampulares y las zonas extraestriolares de las máculas mediante terminaciones en botones o dimórficas, generan respuestas tónicas con baja sensibilidad a las fuerzas lineales y angulares, y tienen baja respuesta a la estimulación eferente (Vaamonde, 2001; Eatock y Songer, 2011; Flores *et al.*, 2001).

El nervio vestibular es una rama del VIII par craneal (Tascioglu, 2005), la mayoría de sus axones terminan en los núcleos vestibulares homolaterales en el tronco del encéfalo, sin embargo algunos axones terminan directamente en el lóbulo flóculo-nodular del cerebelo (Kandel, Schwartz y Jessell, 2001; Vaamonde, 2001; Bear, Connors y Paradiso, 2016).

Los núcleos vestibulares son centros de integración que reciben aferencias de las NAV, de núcleos vestibulares contralaterales, del cerebelo y de los sistemas visual, somático y propioceptivo (Purves *et al.*, 2012; Binetti, 2015). Estos núcleos son 4: el superior, lateral,

medial y descendente (*figura 1.5*). En los núcleos vestibulares hay variantes neuronales; el tipo I o activadoras, se dividen en neuronas cinéticas y tónicas; las cinéticas reciben impulsos monosinápticos desde la periferia y no tienen actividad espontánea, sin embargo, sí tienen un umbral de excitabilidad alto, las tónicas reciben impulsos a través de circuitos multisinápticos, tienen actividad espontánea y umbral de excitabilidad bajo. La segunda variante neuronal es el tipo II o inhibidoras (Binetti, 2015). Los núcleos vestibulares son responsables del reflejo vestíbulo-cólico (RVC) que ayuda a mantener la postura de la cabeza, del reflejo vestíbulo-espinal (RVE) que mantiene la postura del cuerpo y el tono muscular, y del reflejo vestíbulo-ocular (ROV) que ayuda a mantener la mirada en un punto fijo (Purves *et al.*, 2012; Vaamonde, 2001).

Los núcleos vestibulares superiores y laterales establecen conexiones con los núcleos ventral posterior y ventral lateral del tálamo, y desde ahí se proyectan a las áreas corticales correspondientes a las áreas de Brodman: 2v en la punta del surco intraparietal, área 3av en el surco central, la corteza parietoinsular cerca de la ínsula posterior y el área 7 en el lóbulo parietal inferior. Estas áreas están involucradas en el procesamiento de la información vestibular. La corteza parietoinsular vestibular es usualmente descrita como la corteza vestibular principal, ya que un tercio de sus neuronas son sensibles a los estímulos vestibulares. Sus neuronas conforman un sistema multimodal pues reciben información vestibular, visual y somatosensorial, está involucrada en el reconocimiento y control de la posición de la cabeza, la estabilización de la mirada y la posición del cuerpo en el espacio (Tascioglu, 2005; Kandel *et al.*, 2001; Binetti, 2015; Seseña, 2009).

### **Excitabilidad de las NAV**

La actividad eléctrica de las NAV está en función de la activación de varios tipos de receptores y de la modulación de las corrientes iónicas. El principal neurotransmisor que se libera en la sinapsis célula ciliada-NAV es el glutamato, mientras que el principal neurotransmisor que se libera entre la neurona eferente-NAV es la acetilcolina (ACh) (Soto *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2001).

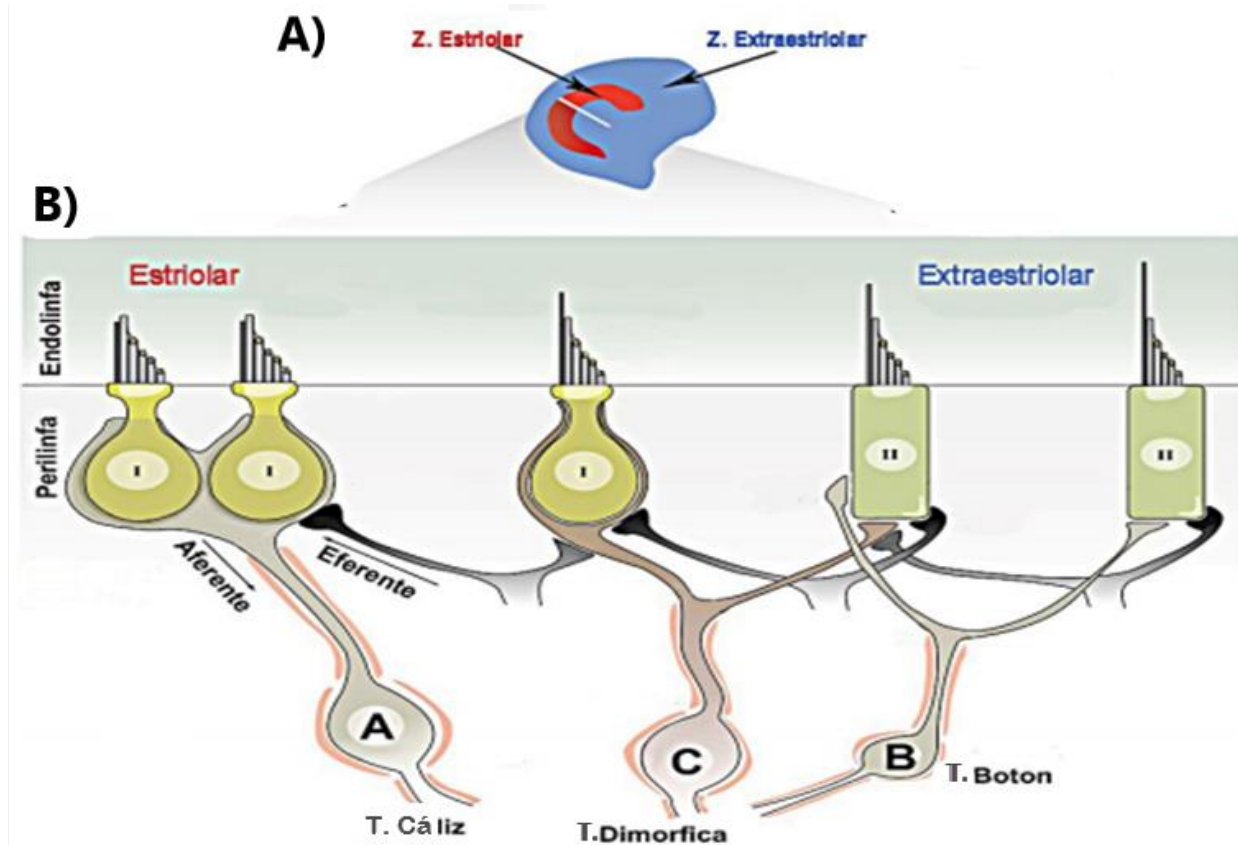
En las NAV se han descrito receptores para aminoácidos excitadores (EAA: glutamato y aspartato), incluido el receptor para ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), para  $\alpha$ -amino-3-

hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propiónico ácido (AMPA), receptores de ácido kaínico (KA) y receptores metabotrópicos para el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Flores *et al.*, 2001). Los receptores NMDA participan en la determinación de la descarga basal y en la respuesta tónica a los estímulos sostenidos, mientras que los receptores no NMDA parecen mediar las respuestas a la estimulación mecánica de alta frecuencia (Soto, Flores, Eróstegui y Vega, 1994; Pérez, Soto y Vega, 1991; Soto, Chavéz, Valli, Benvenuti y Vega, 2001; Soto *et al.*, 2013).

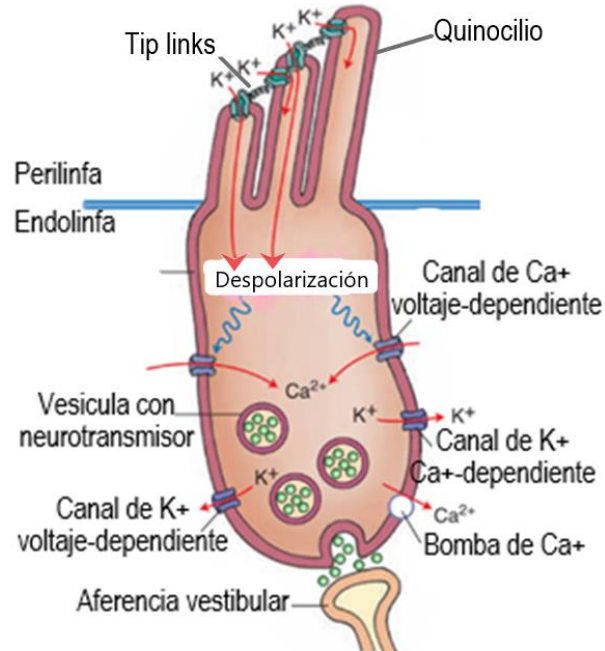
Las NAV también presentan receptores de histamina: H1, H2, H3 y H4 (Soto *et al.*, 2001; Chávez, Vega y Soto, 2005; Martín-Aragón y Bermejo-Bescós, 2010), receptores de dopamina D1 y D2 (Soto y Vega, 2010; Soto *et al.*, 2013), receptores nicotínicos, receptores muscarínicos m1, m2 y m5 (Pérez, Limón, Vega y Soto, 2009; Pérez, Vega y Soto, 2010), receptores a opioides  $\mu$  y  $\kappa$  (Seseña, 2009; Seseña *et al.*, 2014) y receptores peptídicos de FRFamida (Mercado, *et al.*, 2012), entre otros.

### **Canales iónicos voltaje dependientes en las NAV**

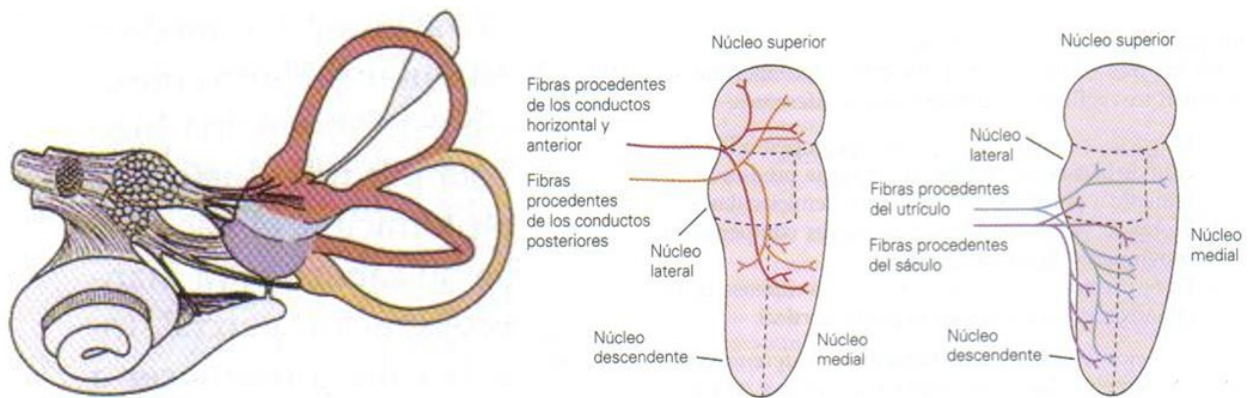
En modelos animales de rata, ratón, pez, ajolote y rana se ha determinado que las NAV expresan diferentes canales iónicos dependientes de voltaje, que determinan la morfología del potencial de acción y la frecuencia de descarga (*figura 1.3*). Las NAV expresan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, N, R, P / Q y T (Seseña, 2009; Seseña *et al.* 2014; Soto *et al.*, 2013), canales de  $\text{Na}^+$  (Liu, *et al.*, 2016), canales de  $\text{K}^+$  (Iwasaki, Chihara, Komuta, Ito y Sahara, 2008), canales de  $\text{K}^+$  activados por calcio (Limón, Pérez, Vega y Soto, 2005), canales de  $\text{K}^+$  activados por sodio (Cervantes, Vega, Limón y Soto, 2013), canales KCNQ responsables de la corriente  $I_M$  (Pérez *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2010) y canales HCN (Almanza, Luis, Mercado, Vega y Soto, 2012).



**Figura 1.3. Clasificación morfológica de las células ciliadas y de las NAV.** A) Esquema de la mácula que muestra la zona estriolar (roja) rodeada por la zona extraestriolar (azul). En el sáculo y el utrículo, la estriola divide las células ciliadas en poblaciones con polaridades opuestas de los cilios. B) Las células ciliadas vestibulares tipo I tienen forma de botella de cuello angosto y las tipo II son cilíndricas. Las NAV tienen terminales en forma de cáliz (A), dimórficas (C) y en forma de botón (B). Las fibras oscuras son neuronas eferentes, que surgen de neuronas del tronco encefálico. Las NAV tipo C inervan el centro y la estriola, las tipo B inervan la zona periférica y la extraestriola y pueden inervar decenas de células ciliadas tipo II, las tipo C inervan ambas células ciliadas, pero tienen árboles dendríticos más compactos en el centro y en la estriola que en la periferia y la extraestriola (Eatock y Songer, 2011; Eatock *et al.*, 2008).



**Figura 1.4. Mecanotransducción de la célula ciliada.** El desplazamiento mecánico lateral de los estereocilios hacia el quinocilio provoca la despolarización, generando la activación de diversos procesos dentro de la célula ciliada (Siegel y Sapru, 2015).



**Figura 1.5. Núcleos vestibulares y sus inervaciones aferentes.** Los axones de las NAV se proyectan desde el laberinto vestibular hacia cada uno de los núcleos vestibulares localizados en la médula oblonga rostral y en la protuberancia caudal (Kandel *et al.*, 2001).

## B. ENFERMEDADES DEL SISTEMA VESTIBULAR

Una disfunción en el sistema vestibular puede producir vértigo. El vértigo consiste en una percepción de movimiento inexistente, habitualmente rotatorio. El movimiento puede incluir una percepción de que el entorno se mueve con el cuerpo fijo (vértigo objetivo) o de que el cuerpo se mueve con el entorno fijo (vértigo subjetivo) (Prado, *et al.*, 2006; Sauma y Villalobos, 2007). El vértigo se clasifica en vértigo periférico si existe lesión en el vestíbulo o vértigo central cuando la lesión se localiza en sistema nervioso central (Esparza-Rangel, Rodríguez-Sánchez y Benavidez-Insignares, 2013).

Entre las lesiones periféricas se encuentra la enfermedad de Menière, el vértigo posicional paroxístico benigno (VPPB), la neuronitis vestibular, entre otras (Prado, *et al.*, 2006; Sauma y Villalobos, 2007; Kornilova, Temnikova, Naumov, y Solovieva, 2011; Rico-Romero, Ishiwara-Niembro y Sánchez-Pérez, 2012). La enfermedad de Menière probablemente se produce por una dilatación de las membranas laberínticas por deficiencias en la absorción de la endolinfa, lo que produce ruptura de las membranas endolinfáticas, provocando la mezcla de endolinfa y perilinfa lo que altera el potencial receptor de las células ciliadas (Prado, *et al.*, 2006; Sauma y Villalobos, 2007; Vázquez, Gómez y Domínguez). El VPPB, se trata de episodios de vértigo de corta duración, inducido por cambios posturales, la etiología se asocia a traumatismo craneoencefálico, procesos infecciosos, canalitiasis o cupulolitiasis (Prado, *et al.*, 2006; Sauma y Villalobos, 2007; Rico-Romero *et al.*, 2012). La neuronitis vestibular, se caracteriza por la anulación de forma súbita de la función vestibular, suele ser unilateral, y su etiología se asocia a alteraciones de la microcirculación del nervio vestibular. En el vértigo central, se ha sugerido que las causas se deben a enfermedades generalmente vasculares, enfermedades inflamatorias/infecciosas, traumatismos del tronco encefálico, anomalías congénitas, enfermedades metabólicas, tóxicos, faltas nutricionales, neoplasias y enfermedades degenerativas (Esparza *et al.*, 2013; Kornilova *et al.* 2011).

## ANTECEDENTES

### A. FAMILIA DE LOS CANALES DE K<sup>+</sup> RECTIFICANTES DE ENTRADA (K<sub>ir</sub>)

Los canales de K<sup>+</sup> rectificantes de entrada (K<sub>ir</sub>) participan en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo y en la regulación de la excitabilidad celular. El término *rectificante de entrada* se refiere a que, a partir del voltaje de equilibrio para K<sup>+</sup> la corriente hacia afuera es más pequeña (pero no cero) que la corriente hacia adentro, debido a la oclusión del poro central por Mg<sup>2+</sup> intracelular y poliaminas (Lüscher y Slesinger, 2010). La familia de canales K<sub>ir</sub> se clasifican en: canales clásicos (K<sub>ir</sub>2), canales sensibles a ATP (K<sub>ir</sub>6 / K<sub>ATP</sub>), canales de transporte (K<sub>ir</sub>1, K<sub>ir</sub>4, K<sub>ir</sub>5 y K<sub>ir</sub>7) y canales activados por proteína G (K<sub>ir</sub>3 / K<sub>G</sub> / GIRK). Por otra parte se pueden clasificar en canales rectificadores *fuertes* (K<sub>ir</sub>2 y K<sub>ir</sub>3), *intermedios* (K<sub>ir</sub>4) y *débiles* (K<sub>ir</sub>1.1 y K<sub>ir</sub>6) (Hibino, *et al.*, 2010).

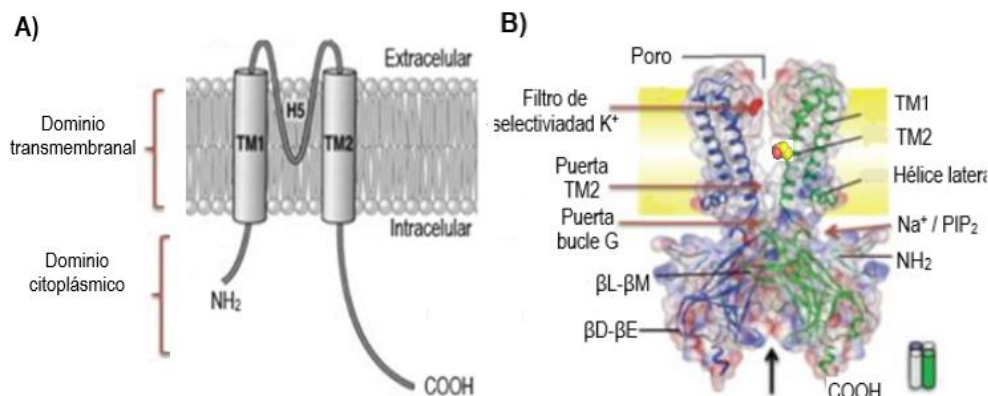
### B. CANALES DE K<sup>+</sup> RECTIFICANTES DE ENTRADA ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GIRK)

Los canales GIRK hiperpolarizan a las neuronas en respuesta a la activación de varios receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés), disminuyendo la excitabilidad de las neuronas. En células con GPCR activados permanentemente contribuyen ~8 mV en el voltaje de membrana (Lüscher y Slesinger, 2010). Los canales GIRK funcionalmente participan en la modulación de la frecuencia cardíaca, memoria y aprendizaje, y percepción del dolor, también están implicados en la fisiopatología de la epilepsia, el síndrome de Down, enfermedad de Parkinson, la adicción y en la ansiedad (Hibino, *et al.*, 2010; Lüscher y Slesinger, 2010).

El canal GIRK es una proteína de membrana tetramérica (*figura 1.6*) cuyo ensamblaje del canal puede ser homomérico o heteromérico dependiendo del tipo celular. En los mamíferos se expresan cuatro subunidades GIRK1, GIRK2, GIRK3 y GIRK4 (Lüscher y Slesinger, 2010; Hibino, *et al.*, 2010; Kobayashi, *et al.*, 1999). Las subunidades GIRK4 se han encontrado mayoritariamente en miocitos auriculares, mientras que las subunidades



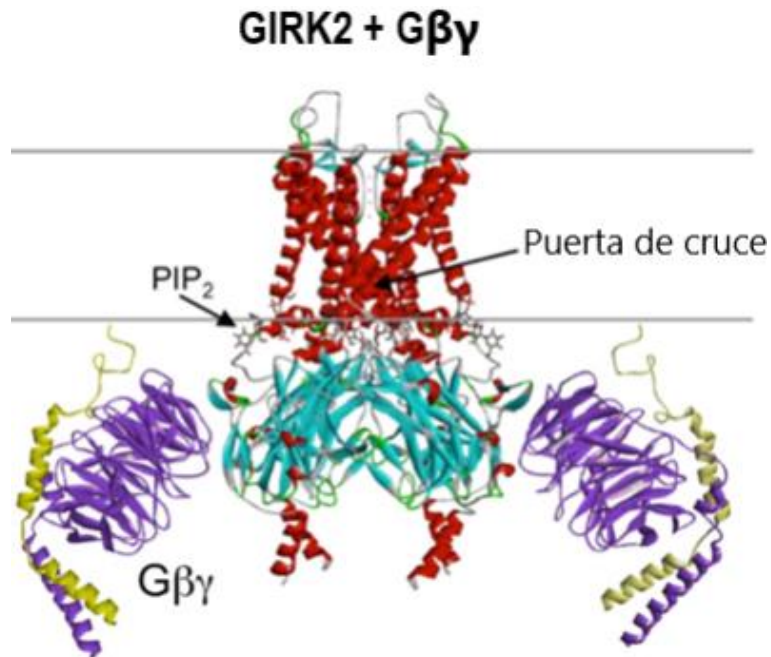
GIRK1-3 se han encontrado mayoritariamente en el cerebro, además la subunidad GIRK2 exhibe patrones de expresión diferencial en el cerebro, el páncreas y el testículo. Los homómeros de las subunidades GIRK1 y GIRK3 no son funcionales, GIRK2 puede formar homómeros funcionales y suelen formar heterómeros con GIRK1 o GIRK3 (Lüscher y Slesinger, 2010). Las subunidades GIRK3 se localizan en compartimentos de membrana y GIRK2 contiene una señal de exportación del RE así como un motivo de internalización. GIRK1 carece de una señal de exportación del RE y debe asociarse con otra subunidad GIRK (GIRK2 o GIRK3) para expresarse en la membrana plasmática. GIRK3 tiene una secuencia de orientación lisosomal YWSI (promueve la degradación de los canales GIRK) y no se difunden libremente por la membrana plasmática (Lüscher y Slesinger, 2010; Hibino, *et al.*, 2010).



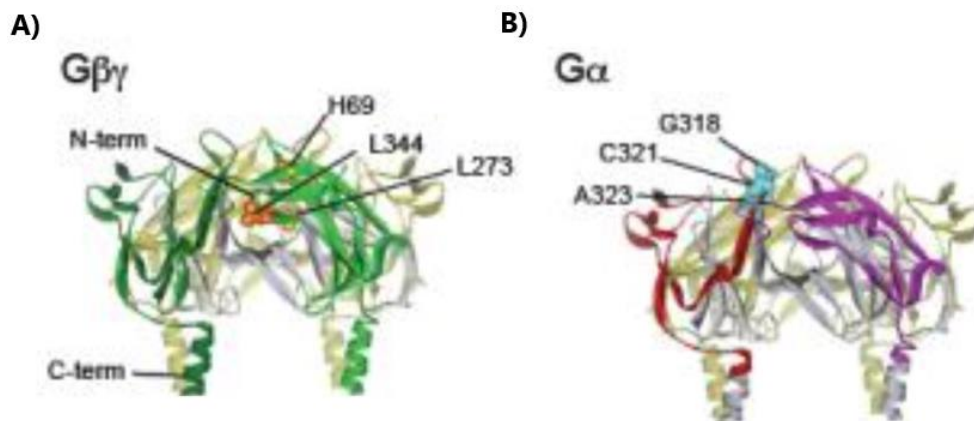
**Figura 1.6. Estructura del canal GIRK.** **A)** Representación de una subunidad del canal GIRK. El dominio transmembrana comprende tres hélices; TM1, poro (H5) y TM2, y en el dominio citoplásmico se encuentran el NH<sub>2</sub> y COOH terminal. **B)** Ensamble tetramérico del canal GIRK. En el dominio transmembrana se indican varias estructuras importantes para la función del canal GIRK. En la interfaz membrana-citoplasma hay una hélice lateral anfifílica. El residuo que es en gran parte responsable de la interacción con poliaminas y Mg<sup>2+</sup> está indicado por las esferas de color amarillo / rojas. El dominio citoplásmico es una extensión del poro que permite la permeación del ion. Los canales GIRK requieren el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato asociado a la membrana (PIP<sub>2</sub>) para su activación o regulación, los residuos de aminoácidos que permiten esta interacción se distribuyen en la superficie del dominio citoplásmico hacia la membrana plasmática. Algunos residuos asociados con la rectificación hacia adentro se ubican a lo largo de esta cavidad. Algunas subunidades de los canales GIRK, como GIRK2 y GIRK4, también pueden activarse por Na<sup>+</sup>. La subunidad de enfrente fue omitida para mayor claridad del esquema (Lüscher y Slesinger, 2010; Hibino, *et al.*, 2010).

La activación de los canales GIRK incluye una amplia gama de GPCR, entre ellos receptores para acetilcolina, dopamina (D2), opioides, serotonina, somatostatina, adenosina, GABA (GABA<sub>B</sub> postsinápticos) y glutamato (mGluRs). Estos receptores están acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$  o G $\alpha_q$  (Lüscher y Slesinger, 2010; Hibino, *et al.*, 2010).

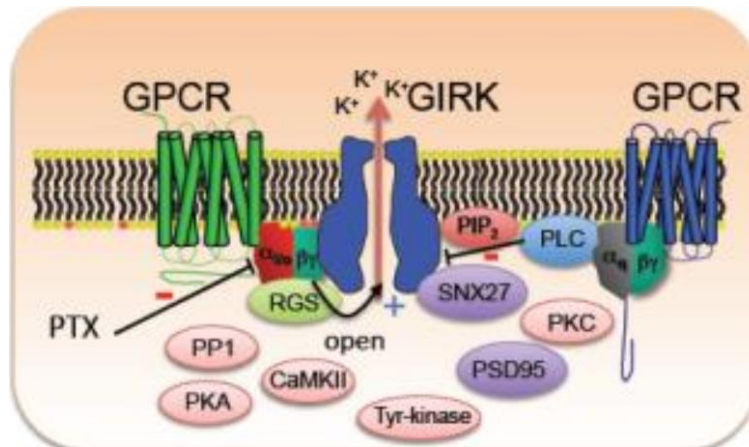
La activación de los canales GIRK ocurre por el complejo G $\beta\gamma$  anclado a la membrana y no a través de segundos mensajeros citoplásmicos (*figura 1.7*) (Lüscher y Slesinger, 2010; Hibino, *et al.*, 2010). La proteína G $\beta\gamma$  es liberada después de la activación del GPCR e interacciona directamente con las terminales NH<sub>2</sub> y COOH de las subunidades GIRK (*figura 1.8*), en los residuos H64, L262 y L339 en GIRK4, L344 y G347 en GIRK2, H57, L262, L333 y E336 en GIRK1 (Lüscher y Slesinger, 2010; Hibino, *et al.*, 2010). La unión de G $\beta\gamma$  con la subunidad GIRK genera flexión de la hélice TM2 en la bisagra Gly, induciendo la rotación y expansión en las terminaciones NH<sub>2</sub> y COOH, generando la apertura del canal. Las proteínas reguladoras de señalización de proteínas G (RGS) aceleran la hidrólisis del GTP por la subunidad G $\alpha$ , reducen la cantidad de G $\beta\gamma$  libre y disminuyen la actividad de los canales GIRK (Hibino, *et al.*, 2010). La activación de G $\alpha_q$  estimula la PLC, activa PKC, disminuye PIP<sub>2</sub> de la membrana plasmática, y con ello reduce la actividad del canal GIRK (*figura 1.9*) (Lüscher y Slesinger, 2010).



**Figura 1.7. Estructura del canal GIRK2 en alta resolución.** Estructura del canal GIRK2 con presencia de Gβγ y PIP<sub>2</sub> en el dominio citoplásmico, y en el dominio transmembrana se muestra la puerta de cruce del ión. Los canales GIRK se activan por la interacción directa con la subunidad Gβγ de la proteína G (Nichols y Slesinger, 2017).



**Figura 1.8. Dominio citoplásmico del canal GIRK2 y los residuos aminoacídicos asociados con la interacción de las subunidades de la proteína G.** Los sitios de modulación se muestran desde una vista lateral en dos subunidades adyacentes. **A)** Las regiones implicadas en la activación por Gβγ están en la hebra β en H69, L273 (en verde claro y oscuro) y L344 (amarillo). **B)** Las regiones implicadas en la activación por Gα<sub>i/o</sub> están en la hebra β en G318, C321 (en rosa) y A323 (en azul) (Lüscher y Slesinger, 2010).



**Figura 1.9. Complejo de señalización macromolecular del canal GIRK.** El complejo se compone de un canal GIRK, un GPCR que se acopla a la subunidad  $G\alpha_{i/o}$  de la proteína G sensible a PTX, una proteína RGS, SNX27 y posiblemente PSD95. La activación de  $G\beta\gamma$  abre canales GIRK. Otros moduladores de los canales GIRK son: tirosina quinasa, CaMKII, PKA/PKC y las fosfatas PP1. También se muestra un segundo GPCR que se acopla a la ruta Gq. La activación de esta vía estimula la enzima PLC, lo que conduce a la activación de PKC y al agotamiento de  $PIP_2$ , los cuales reducen la actividad del canal GIRK (Lüscher y Slesinger, 2010).

La pérdida de la función GIRK puede conducir a la excitabilidad excesiva de las células. En el cerebro de ratones *knockout* para GIRK2 se presenta una reducción de la expresión de GIRK1 lo que contribuye a convulsiones espontáneas y esporádicas como resultado de la pérdida de potenciales postsinápticos inhibitorios y por la hiperexcitabilidad neuronal (Hibino, *et al.*, 2010); mientras que la ganancia de la función GIRK puede reducir significativamente la actividad neuronal, como se postula en el síndrome de Down. El cromosoma 21 en humano contiene el gen para GIRK2 (*Kcnj6*), al duplicar parcial o completamente el segmento del cromosoma 16 de ratón (ortólogo del cromosoma 21 en humano) se presenta una regulación positiva de la proteína GIRK2, generando una corriente postsináptica excitatoria, este efecto es mediado en mayor parte por receptores  $GABA_B$  (Lüscher y Slesinger, 2010).

Además se ha reportado la participación de los canales GIRK en la enfermedad de Parkinson. En ratones weaver (*wv*) los canales GIRK2 constitutivamente activos

producen despolarización crónica y muerte celular en un subconjunto de neuronas en el cerebro que imita la degeneración neuronal observada en esta enfermedad (Lüscher y Slesinger, 2010). Los canales GIRK3 participan en la fibrilación auricular crónica (FAc). La FAc causa un aumento en la  $I_{K_{ACh}}$ , este cambio lleva a los canales GIRK a acortar la duración del potencial de acción auricular y el período refractario. También se cree que los canales GIRK participan en los efectos gratificantes agudos o en la adaptación a drogas adictivas que funcionan a través de GPCR como los opiáceos, fármacos de club como el  $\gamma$ -hidroxibutirato (GHB) y los cannabinoides (Hibino, *et al.*, 2010; Lüscher y Slesinger, 2010).

### **Modulación de los canales GIRK por opioides**

Los opioides se clasifican en dos grandes grupos; opioides endógenos y exógenos. El sistema opioide endógeno participa en la regulación del dolor, en las funciones gastrointestinales, endócrinas, autonómicas, en el aprendizaje y en la memoria. Además tienen un papel muy relevante en el circuito cerebral de recompensa y la adicción. Los opioides exógenos pueden clasificarse según su origen (naturales, semi-sintéticos y sintéticos), su estructura química o su afinidad / eficacia sobre los receptores a opioides (Álvarez y Farré, 2005).

Los opioides producen sus efectos a través de GPCR ( $G\alpha_{i/o}$ ), que se encuentran en el cerebro (en áreas como la sustancia gris periacueductal), en la médula espinal y en la periferia (en los plexos mientéricos digestivos y en las articulaciones). Se han descrito cuatro tipos de receptores opioides en humanos:  $\mu$  (MOR),  $\delta$  (DOR),  $\kappa$  (KOR) y nociceptina (NOR) (Álvarez y Farré, 2005; Hernández y Cruz, 2005).

Los canales GIRK modulan la analgesia mediada por opioides sistémicos a través de la inhibición postsináptica (Nagi y Pineyo, 2014; Lüscher y Slesinger, 2010). Esto fue sugerido por estudios realizados en ratas con mutaciones en las subunidades GIRK2, generando insensibilidad a la activación de la proteína G, provocando respuestas analgésicas reducidas a la morfina. La eliminación de las subunidades GIRK2 y GIRK3 interfiere con la capacidad analgésica de la morfina en la prueba de placa caliente, esta respuesta involucra la integración supraespinal. Los posibles sitios de analgesia

supraespinal mediada por GIRK pueden incluir el tálamo y la corteza límbica, porque expresan las subunidades GIRK1, 2, 3 y receptores a opioides  $\mu$  y  $\kappa$ . El silenciamiento de las subunidades GIRK1 o GIRK2 interfiere con la respuesta analgésica de los agonistas de MOR y DOR. Incluso se ha establecido la contribución de los canales GIRK2 a la analgesia opioide periférica, experimentalmente se utilizaron ratones transgénicos para expresar estas subunidades GIRK en las neuronas sensoriales mostrando respuestas analgésicas a la aplicación plantar del agonista específico del receptor opioide  $\mu$ , DAMGO (Nagi y Pineyo, 2014).

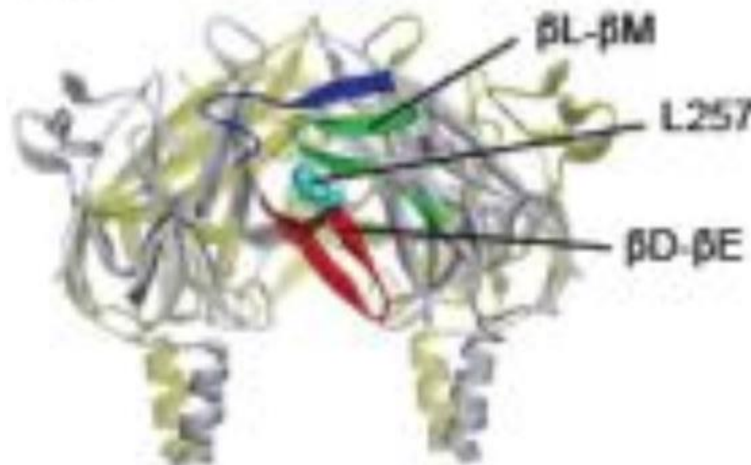
Asimismo los canales GIRK también están asociados con efectos no deseados de los analgésicos opioides. Los agonistas de MOR y DOR silencian a las interneuronas GABAérgicas del hipocampo mediante un mecanismo por canales GIRK y por canales de  $K^+$  dependientes de voltaje, lo que produce convulsiones (Nagi y Pineyo, 2014). Incluso la morfina y Met-enkefalina provocan desensibilización del canal GIRK *in vitro* e *in vivo*. En cuanto a la dependencia de opioides, experimentos en ratones que carecen de las subunidades GIRK2 y GIRK3 muestran signos de abstinencia muy reducidos, comparados con los inducidos en ratones silvestres por el antagonista naloxona después de la exposición crónica a la morfina. En los ratones mutantes, el síndrome de abstinencia se recupera si la salida de las neuronas de locus coeruleus se inhibe durante la exposición a la morfina. Esto sugiere que los canales GIRK son la *puerta* a la inducción de la dependencia a los opioides mediante el silenciamiento de las neuronas en el locus coeruleus cada vez que se inyectan opioides (Lüscher y Slesinger, 2010).

### **Modulación de los canales GIRK por alcoholes**

Otros activadores de los canales GIRK son los n-alcoholes (Toyama, *et al.*, 2018; Kobayashi, *et al.*, 1999; Lewohl, *et al.*, 1999). La activación de los canales GIRK por etanol sucede en un sitio específico del canal, no involucra vías de señalización acopladas a proteína G, ni a otros segundos mensajeros. El etanol en las neuronas del área tegmental ventral (VTA) de roedores potencia las corrientes GIRK activadas por GABA<sub>B</sub>, disminuyendo la frecuencia de disparo de las neuronas DA del VTA (Lüscher y Slesinger, 2010). El etanol activa los canales GIRK1/2 y GIRK1/4 en ovocitos de *Xenopus*

spp transfectados, induciendo de forma inmediata y reversible corrientes rectificantes de entrada. Los n-alcoholes como metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol y 1-pentanol también pueden modular la actividad del canal GIRK1/2 y GIRK1/4. En los canales GIRK1/2 la aplicación de metanol a 1-butanol induce la corriente, pero 1-pentanol la inhibe, y en canales GIRK1/4 la aplicación de metanol a 1-propanol induce la corriente GIRK, pero 1-butanol y 1-pentanol la inhibe (Kobayashi, *et al.*, 1999; Lewohl, *et al.*, 1999).

Se ha identificado que etanol interactúa con el dominio citoplásmico de los canales GIRK. El sitio para la activación es un *bolsillo* hidrofóbico, formado por el dominio NH<sub>2</sub>-terminal, y las láminas  $\beta$ D- $\beta$ E y  $\beta$ L- $\beta$ M del COOH-terminal de los canales GIRK, ubicado en la interfaz entre las dos regiones citoplásmicas vecinas, además induce reordenamientos dinámicos y estructurales del bucle G citoplásmico (*figura 1.10*) (Lüscher y Slesinger, 2010; Toyama, *et al.*, 2018). La activación de GIRK por etanol puede ser potenciada cooperativamente por otros activadores de GIRK, como PIP<sub>2</sub> y colesterol, que generalmente están presentes en las membranas celulares (Toyama, *et al.*, 2018).



**Figura 1.10. Regiones de los canales GIRK implicadas en la activación por etanol.** Vista lateral de la región citoplásmica de dos subunidades adyacentes donde se muestran las regiones implicadas en la activación dependiente de etanol: N-terminal (azul), hoja  $\beta$ D- $\beta$ E (rojo), hoja  $\beta$ L- $\beta$ M (verde) y el residuo L257 (cian) (Lüscher y Slesinger, 2010).

### C. EL ALCOHOL Y SUS EFECTOS EN EL ORGANISMO

El alcohol a nivel celular es deshidratante, lesiona a las células y puede llegar a causar la muerte celular; puede actuar directamente sobre las proteínas de las membranas produciendo cambios conformacionales que alteren su función; puede modificar la organización de las moléculas de agua en la matriz extracelular mediante la formación de puentes de hidrógeno, alterando los dominios que determinan la solvencia de los ligandos o de los iones que interaccionan con las proteínas receptoras; y puede interactuar con elementos receptivos para el alcohol que son proteínas neuronales sensibles al etanol (Medina, 2006).

La intoxicación aguda por etanol provoca la inhibición de los canales de  $\text{Ca}^{+}$  dependientes de voltaje lo que interfiere con la liberación de neurotransmisores, e inhibe canales de  $\text{Na}^{+}$  dependientes de voltaje ( $\text{Na}_v$  1.2,  $\text{Na}_v$  1.4,  $\text{Na}_v$  1.6 y  $\text{Na}_v$  1.8) lo que afecta la generación de potenciales de acción en ganglios de la raíz dorsal y en ovocitos de *Xenopus* spp transfectados. Altas concentraciones de etanol también disminuye la función de la bomba  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$  ATPasa, la cadena transportadora de electrones y puede modificar el metabolismo de muchos neurotransmisores (Medina, 2006; Horishita y Harris, 2008).

La exposición aguda al alcohol inhibe la respuesta del receptor NMDA en el hipocampo, corteza, cuerpo estriado y tálamo (Medina, 2006; Modig, 2013; Lirola, 2010). La exposición crónica lleva a una hipersensibilidad adaptativa, genera dependencia y tolerancia.

A nivel sistémico el alcohol es un depresor general de acción inespecífica, aunque el alcohol puede generar efectos inhibidores y excitadores dependiendo del circuito neuronal afectado, generalmente las neuronas inhibitorias se afectan primero. La acción depresiva del etanol en el cerebro está relacionada con la interacción con los receptores NMDA y los sistemas GABAérgico, noradrenérgico y colinérgico (Lirola, 2010). Al iniciar la ingesta de alcohol o con baja concentración se produce un incremento de la actividad del individuo debido a la liberación de los centros cerebrales inferiores por depresión de los centros corticales superiores. Se afectan los centros subcorticales del tallo cerebral,



incluyendo los vestibulares, y el cerebelo. Conforme aumenta el nivel de alcoholemia después se afectan los centros espinales provocando sueño profundo, inconsciencia, estupor, llegando al coma, semejante a la anestesia general, y se deprimen los centros bulbares (vasomotor, respiratorio) existiendo peligro de muerte (Medina, 2006).

### **El alcohol y su efecto sobre el sistema vestibular**

Diversos estudios han demostrado que la intoxicación por alcohol produce alteraciones periféricas y centrales en la función vestibular y oculomotora. Esto se refleja en alteraciones de la función del reflejo vestíbulo-ocular (RVO), como el nistagmo posicional alcohólico (NPA), ataxia vestíbulo-cerebelar y alteraciones en los movimientos oculares sacádicos voluntarios (Lirola, 2010; Roth, *et al.*, 2014).

La ingesta de alcohol altera el RVO reduciendo la visión efectiva durante las rotaciones de la cabeza, y la agudeza visual dinámica (Roth, *et al.*, 2014). El NPA aparece tras la ingesta de 1 g de alcohol etílico / kg de peso corporal o con niveles en sangre superiores a 40 mg / dl (Lirola, 2010; Modig, 2013). El alcohol difunde inicialmente de manera selectiva hacia la cúpula del conducto semicircular horizontal debido a su proximidad a los capilares, el alcohol modifica la osmolaridad, generando un gradiente transitorio de densidad entre la cúpula y la endolinfa, al ser más ligero provoca que la cúpula disminuya su densidad. Así la cúpula se sensibiliza a cambios de orientación, transformando los conductos semicirculares en receptores gravitatorios y haciéndolos sensibles a aceleraciones lineales, porque en condiciones normales la cúpula tiene la misma gravedad específica que la endolinfa, teniendo una flotabilidad neutral (Benito-Orejas, Valda-Rodrigo y Vielba-Varea, 2018; Lirola, 2010; Medina, 2006). En la primera fase del NPA, se presenta vértigo rotatorio y un nistagmo geotrópico de cada lado. Progresivamente el alcohol se difunde en la endolinfa de los conductos semicirculares, igualando la gravedad específica de la cúpula, donde aparece un periodo silente (3 a 5 horas después de finalizar la ingesta del alcohol), y el NPA está ausente. La fase II del NPA aparece entre las 5 y 10 horas después del cese de la bebida, cuando los niveles en sangre bajan a 20 mg / dl. El alcohol que sale por difusión de la cúpula vuelve a la endolinfa, esto hace que la cúpula sea transitoriamente más densa que la endolinfa,

generando un nistagmo ageotrópico bilateral, y junto con el vértigo posicional pueden persistir hasta que el alcohol abandona la endolinfa horas después de que el alcohol en sangre haya desaparecido (Lirola, 2010; Benito *et al.*, 2018; Franco-Gutiérrez y Pérez-Vázquez, 2013).

El consumo de etanol retrasa la latencia y disminuye la velocidad máxima de las sacadas, mientras que la búsqueda suave se vuelve cada vez más sacádica. En la fase lenta del nistagmo provocado por la estimulación rotatoria o calórica y del nistagmo optoquinético, el etanol tiene un efecto amortiguador en la velocidad de fase. El mecanismo de fijación de la mirada también se ve afectado, causando un nistagmo evocado por la mirada, que muestra un aumento de la velocidad al aumentar los niveles de intoxicación (Modig, 2013; Lirola, 2010).

Las neuronas de los núcleos vestibulares son más sensibles al alcohol que las neuronas en los núcleos geniculados trigeminal y medial. Y se sabe que las neuronas aferentes vestibulares y visuales son las más afectadas por el consumo de alcohol, apareciendo alteraciones a concentraciones menores de 0,2 g / l (Modig, 2013; Lirola, 2010).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los canales GIRK son responsables de modificar la comunicación neuronal, están involucrados en los potenciales postsinápticos inhibidores lentos y en la modulación presináptica de la actividad neuronal en diversas áreas del sistema nervioso (Hibino, *et al.*, 2010). Así mismo una gran variedad de GPCR, incluyendo receptores a opioides  $\mu$  y  $\delta$ , acetilcolina, GABA<sub>B</sub>, somatostatina, 5-HT<sub>1</sub>,  $\alpha$ 2-adrenérgico, D2-dopamina y glutamato, son capaces de regular a los canales GIRK, tanto en neuronas, como en células secretoras y en células musculares. Además existen otros activadores de los canales GIRK como los n-alcoholes: metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol (Hibino, *et al.*, 2010; Kobayashi, *et al.*, 1999; Kaufmann, *et al.*, 2013).

Aunque las señales eléctricas básicas del sistema vestibular son relativamente estereotipadas, los canales iónicos responsables de generar estas señales son notablemente diversos en las NAV, además se conoce que se encuentran GPCR como receptores de dopamina (D1 y D2), serotonina (5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>1D</sub>), nicotínicos, muscarínicos (m<sub>1</sub>, m<sub>2</sub> y m<sub>5</sub> en humano y m<sub>1</sub>-m<sub>5</sub> en rata) y receptores a opioides  $\mu$  y  $\kappa$ , entre otros (Soto *et al.*, 2013). Debido a estas propiedades es factible que los canales GIRK estén presentes en las NAV y posiblemente sean modulados por GPCR, influyendo de esta manera en la codificación de la información vestibular.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible que los canales GIRK participen en la compleja actividad eléctrica de las NAV, siendo sujetos de modulación por diversos agonistas a GPCR?

## HIPÓTESIS

Las neuronas aferentes vestibulares expresan la corriente GIRK que es modulada por alcoholes y péptidos opioides. Esta corriente contribuye en la descarga dinámica del potencial de acción.

## JUSTIFICACIÓN

En 2005, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de la ciudad de México realizó un estudio donde describe la frecuencia de discapacidad relacionada a enfermedades vestibulares. Evaluaron a 278 pacientes donde los diagnósticos más frecuentes fueron con 26% laberintopatía asociada a hipertensión arterial sistémica o dislipidemia, seguido de laberintopatía degenerativa en 10%, vértigo postural paroxístico benigno en 7%, enfermedad de Menière en 5%, lesión vestibular relacionada a enfermedad metabólica en 4% y otras posibles causas en el 48%. Solo al 2.5% de los 278 pacientes se les otorgó incapacidad por parte del Centro de Atención Especializada (Gutiérrez-Márquez, Jáuregui-Renaud, Viveros-Renteria y Villanueva-Padrón, 2005).

Las alteraciones del sistema vestibular están débilmente relacionadas a enfermedades que ocasionan la muerte, aun así son serias limitaciones para los individuos que las padecen, impactando en su nivel de vida con deterioro emocional, social y laboral. Estas alteraciones vestibulares son un grave problema por las dificultades en el diagnóstico y por el poco conocimiento que aún se tiene sobre sus causas. Otro gran problema a la hora de determinar una anomalía del sistema vestibular consiste en que son pocos los estudios en NAV (Kornilova *et al.*, 2011).

Determinar la presencia de la corriente GIRK en las NAV en cultivo primario permitirá conocer las contribuciones de estos canales en sus propiedades electrofisiológicas y por consiguiente en la fisiología y patología vestibular. Además el conocimiento de la función de los canales GIRK en las NAV constituirá un potencial objetivo en el futuro para diseñar nuevos tratamientos farmacológicos que podrían aplicarse a diversas patologías

vestibulares, utilizando los diferentes moduladores para la corriente GIRK como alcoholes y péptidos opioides.

## OBJETIVOS

### General

Evidenciar mediante registros de *Patch Clamp*, aplicación de alcoholes y opioides, la presencia de la corriente GIRK y su participación en la descarga dinámica de potenciales de acción en las neuronas aferentes vestibulares.

### Específicos

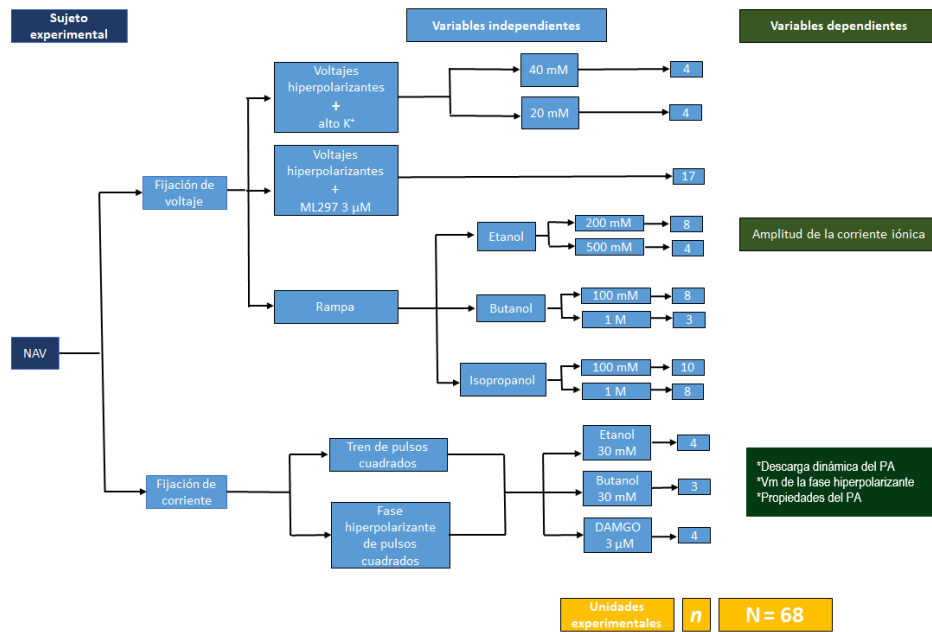
1. Registrar la actividad eléctrica de las NAV con la técnica de fijación de voltaje y con fijación de corriente ante diferentes estímulos eléctricos.
2. Evidenciar la presencia de la  $I_{GIRK}$  con solución extracelular alta en  $K^+$  [20mM] y [40 mM].
3. Evidenciar la presencia de la  $I_{GIRK}$ , utilizando como activadores a los alcoholes etanol [30 mM], [200mM] y [500 mM], butanol [30 mM], [100 mM] y [1 M] e isopropanol [100 mM] y [1 M].
4. Evidenciar la presencia de la  $I_{GIRK}$ , utilizando como activador el agonista opioide DAMGO [3  $\mu$ M].
5. Evidenciar la presencia de la  $I_{GIRK}$ , utilizando el agonista selectivo de los canales GIRK, ML297 [3  $\mu$ M].

## METODOLOGÍA

### Bioética

El proyecto se realizó en el Instituto de Fisiología, BUAP, con animales que son proporcionados por el Bioterio Claude Bernard de la BUAP, obedeciendo el reglamento proporcionado por el Comité de Cuidado y Usos de Animales de Laboratorio (CCUAL), BUAP, el cual declara que el trabajo realizado dentro de la unidad académica cumple los principios bioéticos aceptados internacionalmente y obedece a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, donde se establecen las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Durante la experimentación se cumplió el apartado 9 sobre *eutanasia* de esta norma (SAGARPA, 2001). Con la finalidad de realizar la disección de ganglios vestibulares de ratas *Long Evans* para llevar a cabo el cultivo celular primario de NAV y usarlas en las pruebas electrofisiológicas.

El presente trabajo tuvo un diseño experimental de bloques con tres bloques: control, aplicación del fármaco y lavado. Las unidades muestrales fueron pareadas dado que cada célula se midió en condiciones control, aplicación del fármaco y lavado. Cada unidad experimental fue independiente, lo que indica que en cada célula solo se aplicó un fármaco por célula. Las variables independientes fueron el voltaje y corriente inyectada con los diferentes fármacos, las variables dependientes fueron la amplitud de las corrientes iónicas, parámetros de la descarga dinámica del PA y propiedades del PA más adelante se detallarán la medición de estas variables. En la figura 2 se muestra un esquema del diseño experimental del trabajo.



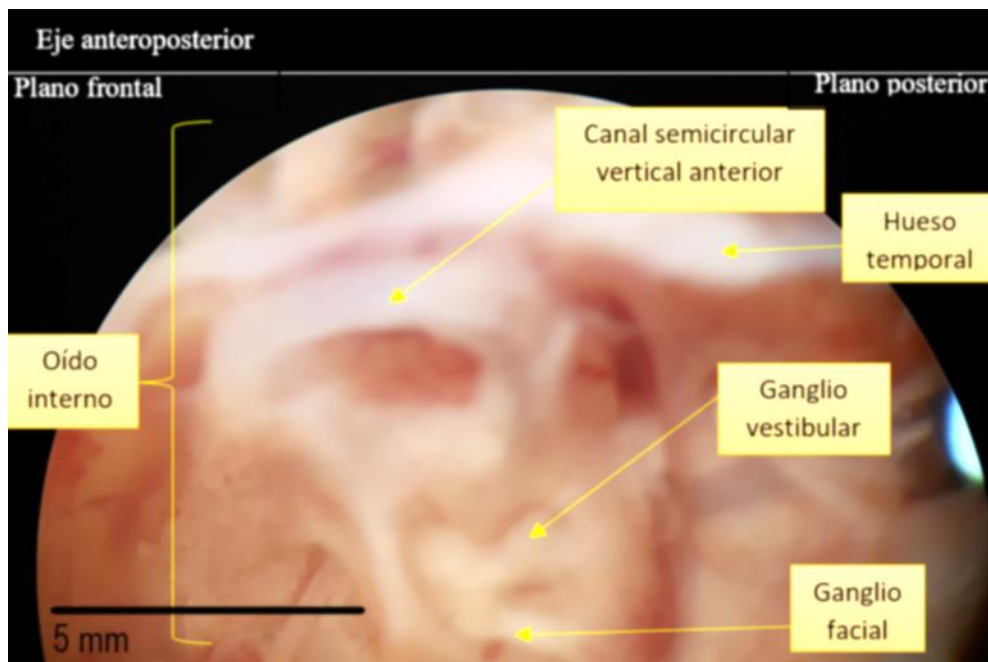
**Figura 2. Esquema del diseño experimental.** Se utilizaron 44 NAV de ratas de 28 a 30 días y 24 NAV de ratas de 7 a 10 días. Varias. En cada cultivo neuronal se utilizaron 3 ratas y se hicieron 2 cultivos por semana. Se utilizaron 100 ratas de 28 a 30 días y 188 ratas de 7 a 10 días.

### Cultivo primario de NAV

Se utilizaron ratas *Long Evans* de la cepa II neonatas de 7 a 10 y de 28 a 30 días sin distinción de sexo, siguiendo la metodología realizada por Soto *et al.* (2002). Se utilizaron dos edades diferentes para asegurar que la respuesta generada por las NAV emulen las condiciones normales del sistema vestibular. Jamon (2014) reportó que al nacer las estructuras vestibulares están morfológicamente bien desarrolladas y al final del primer mes postnatal se logra la maduración completa. Además la expresión de los canales GIRK podría ocurrir en el desarrollo del sistema nervioso después de recién nacidos (Kanjhan, Coulson, Adams y Bellingham, 2005).

El cultivo neuronal se llevó a cabo en una campana de flujo laminar (Nuairé™ UN-201-330). Las ratas se expusieron durante 2 minutos a sevoflurano (Floves®) al 100%, antes de que fueran sacrificadas por decapitación. Tras la decapitación se retiró la bóveda craneana, el encéfalo y el nervio óptico, posteriormente se realizó la disección del ganglio vestibular en ambos lados de la cabeza, en un medio L-15 (Leibovitz, SIGMA®, al 100% a pH 7.4) (figura 2.1), para ello se utilizó un microscopio estereoscópico 10x.

Los ganglios vestibulares se sometieron a disociación enzimática por tripsina de páncreas porcino (SIGMA®) y colagenasa de *Clostridium histolyticum* sp 1A (SIGMA®) a 1.25 mg / ml de medio L-15, la solución se incubó de 10 a 20 minutos a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> (en atmosfera de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>). Posteriormente se llevó a cabo la disociación mecánica, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga clínica (Boston Mass®) y se realizó la agitación con una pipeta Pasteur con 100 µl de medio L-15 modificado con HEPES [15 mM], NaHCO<sub>3</sub> [15 mM], 10% de suero fetal bovino (Fetalgro®) y 1% penicilina/estreptomicina (Gibco®) a pH 7.7. Por último se realizó el sembrado por goteo, para lo cual se tomó 25 µl de la preparación anterior y se colocó sobre cubreobjetos tratados con poli-D-lisina, se incubó por 60 min a 37 °C y finalmente se agregó más medio L-15 modificado. Las células se mantuvieron en la estufa de cultivo aproximadamente 20 hrs a 37 °C, antes de proceder al registro electrofisiológico.



**Figura 2.1. Localización del ganglio vestibular y estructuras asociadas.** Vista superior de la base del cráneo, a través de un objetivo del microscopio estereoscópico 10x.



### Soluciones y fármacos para el registro electrofisiológico

Para los registros electrofisiológicos se prepararon soluciones que emulan las condiciones normales del medio extracelular e intracelular de las células, además se emplearon soluciones modificadas, las concentraciones iónicas se muestran en la tabla 1, los fármacos utilizados y las concentraciones de estos se muestran en la tabla 2 de la sección de anexos.

### Registro electrofisiológico

El *set* para el registro electrofisiológico consiste en una jaula de Faraday, una mesa antivibratoria (NRC *pneumatic isolation mount type XJ-A*), invertoscopio electrónico de contraste de fases (Nikon elwd® 0.3/ OD75), amplificador (HEKA, EPC 800), digidata (Axon™ digidata 1550), micro-manipulador (Sutter instrument Company® MP-285), equipo de perfusión con controlador de válvulas y un posicionador (SCTecnología SPG-6), bomba modificada para succión (ELITE® 800), y el software Clampex® 10.4 (Molecular Devices). En la figura 2.2 se muestra un esquema de trabajo.

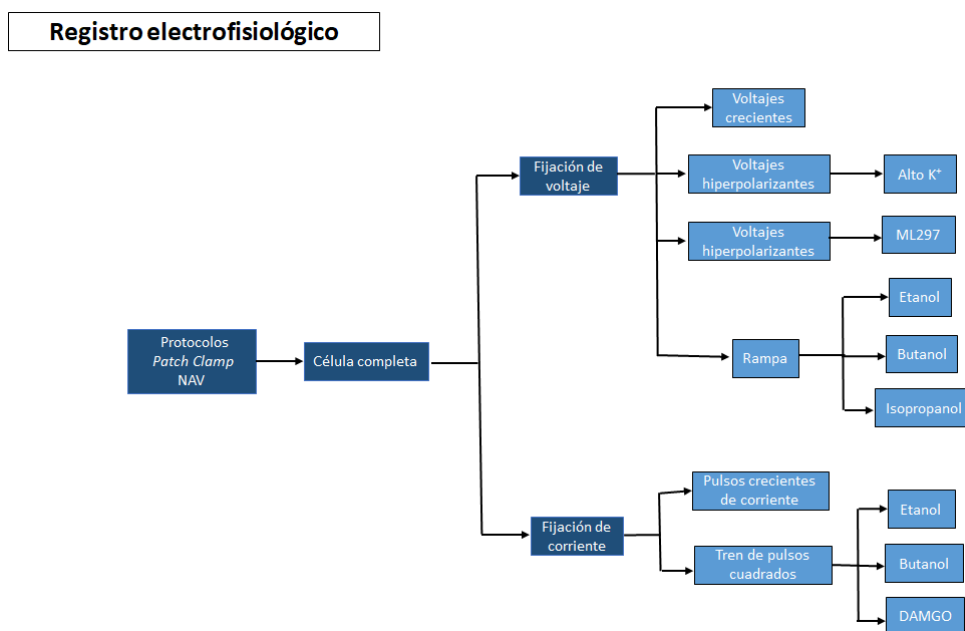
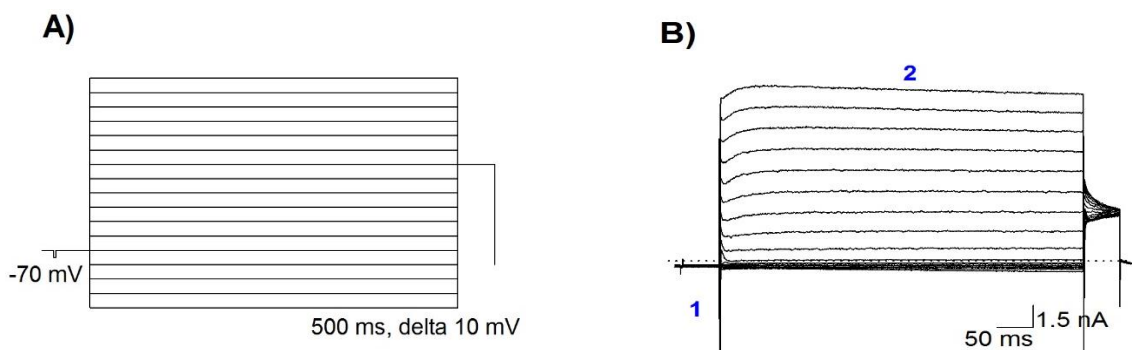


Figura 2.2. Esquema de trabajo.

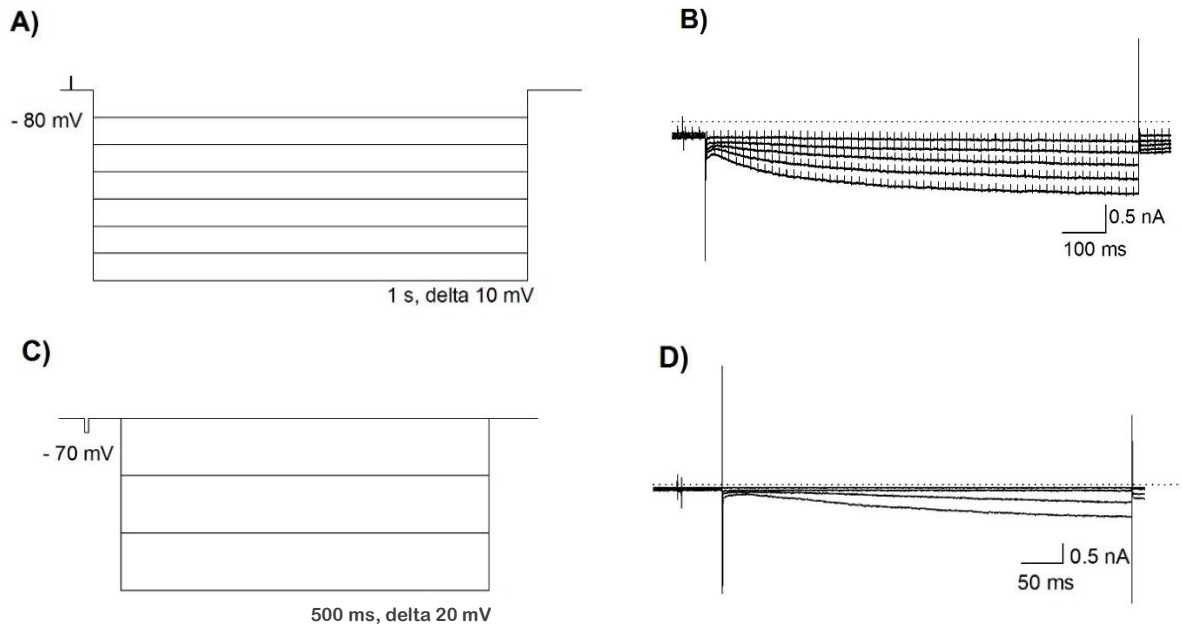
### Protocolos de registro

Utilizamos la técnica de *Patch Clamp* en configuración de célula completa. Primero se empleó un protocolo de *voltajes crecientes* para ver las corrientes totales de la célula, ya que solo las NAV presentan la corriente de  $\text{Na}^+$ . Este protocolo consistió en pulsos cuadrados de -110 a 50 mV, cada 10 mV, con duración de 500 ms por pulso, seguido por un pulso fijo a -10 mV por 50 ms, partiendo de un voltaje de sostenimiento ( $V_H$ ) de -70 mV (figura 2.3).



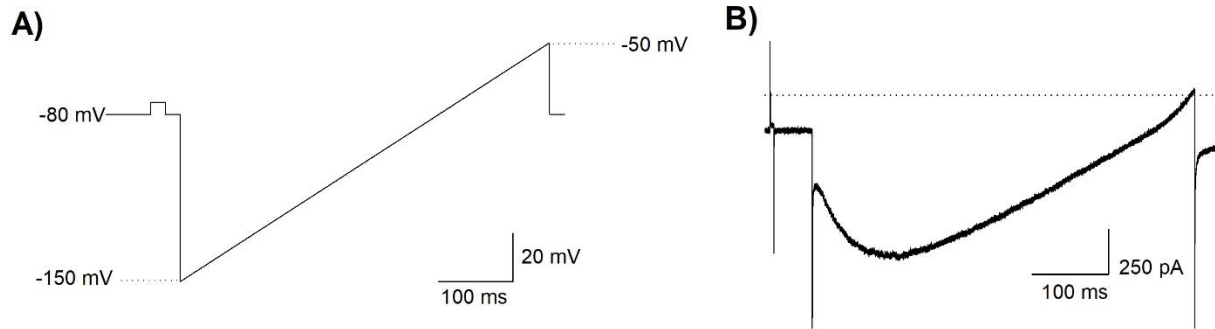
**Figura 2.3. Protocolo de voltajes crecientes y trazo representativo.** A) Protocolo de *voltajes crecientes* en fijación de voltaje. B) Trazo representativo de la corriente iónica registrada con éste protocolo, se observa la corriente entrante (1) y la corriente saliente (2). Línea punteada representa el 0 nA.

Se utilizó un protocolo de *voltajes hiperpolarizantes* para observar las corrientes rectificantes de entrada y evidenciar la presencia de los canales GIRK. Este protocolo consistió en pulsos de estimulación de -100 a -150 mV, cada 10 mV, con duración de 1 s,  $V_H = -80$  mV (figura 2.4 A-B). En otra serie experimental el protocolo de *voltajes hiperpolarizantes* consistió en estimulación de -70 a -130 mV, cada 20 mV, con duración de 500 ms por pulso,  $V_H = -70$  mV (figura 2.4 C-D), en este protocolo aplicamos el fármaco ML297 que es un activador específico de la corriente GIRK.



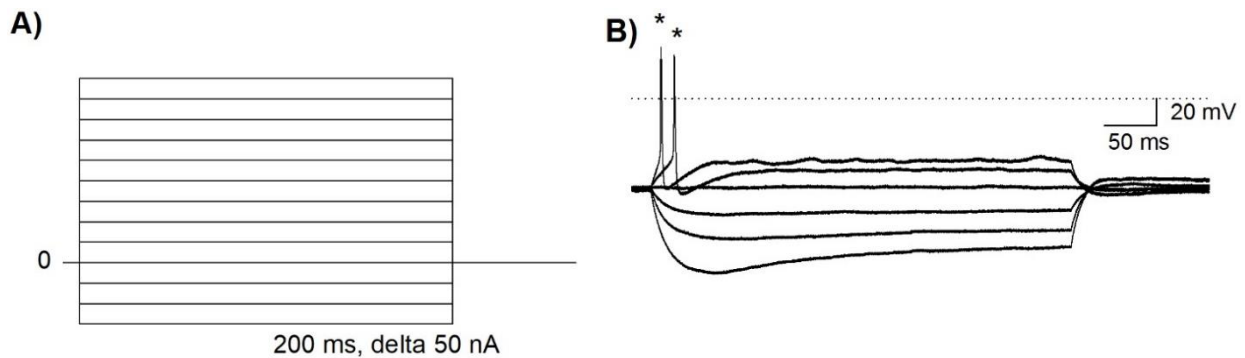
**Figura 2.4. Protocolos de voltajes hiperpolarizantes y trazos representativos.** **A)** Protocolo de voltajes hiperpolarizantes con  $V_H = -80\text{ mV}$  y  $1\text{ s}$  de duración. **B)** Trazo representativo de la corriente iónica registrada con el protocolo mostrado en A. **C)** Protocolo de voltajes hiperpolarizantes con  $V_H = -70\text{ mV}$  y  $500\text{ ms}$  de duración. **D)** Trazo representativo de la corriente iónica con el protocolo mostrado en C. Línea punteada representa  $0\text{ nA}$ .

En otra serie experimental se utilizó el protocolo de *rampa* que consiste en estimulación continua de  $-150$  a  $-50\text{ mV}$  por  $500\text{ ms}$ , partiendo de  $V_H = -80\text{ mV}$  (figura 2.5), el protocolo de rampa es una medida muy sensible de la actividad del canal GIRK. En este protocolo aplicaremos isopropanol, butanol y etanol dado que los canales GIRK pueden ser activados de forma directa por alcoholes (Kobayashi, *et al.*, 1999; Lewohl, *et al.*, 1999).



**Figura 2.5. Protocolo de rampa y trazo representativo.** **A)** Protocolo de rampa con  $V_H = -80$  mV y 500 ms de duración. **B)** Trazo representativo de la corriente iónica registrada con el protocolo mostrado en A. Línea punteada representa 0 nA.

Para el registro de la excitabilidad neuronal de las NAV se utilizó la técnica de fijación de corriente en célula completa. Se usó un protocolo de pulsos *crecientes de corriente* entre -150 a 450 pA, cada 50 pA, con duración de 200 ms por pulso,  $V_H$  entre -80 y -70 mV (figura 2.6).



**Figura 2.6. Protocolo de pulsos crecientes de corriente y trazo representativo.** **A)** Protocolo de pulsos *crecientes de corriente* en fijación de corriente. **B)** Trazo representativo del protocolo mostrado en A. Línea punteada simboliza 0 mV. Los asteriscos representan PA.

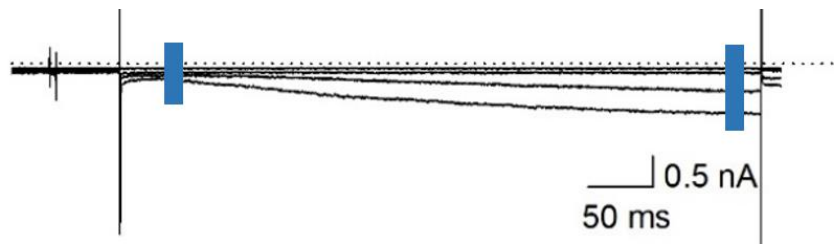
El análisis de la actividad eléctrica de las neuronas nos permite analizar e inferir la dinámica neuronal dentro de un circuito (Purves *et al.*, 2012). La dinámica de la frecuencia de descarga de potenciales de acción conocida como la descarga dinámica nos permite emular una descarga continua de PA y evaluar su modulación en una célula aislada. Para medir la descarga dinámica del PA en NAV utilizamos un *tren de pulsos* con un

componente despolarizante y un componente hiperpolarizante, cada pulso duró 200 ms, y se repitió durante 30 s (150 veces), se seleccionó un estímulo que produjo aproximadamente un PA en el 50% de los pulsos, con un  $V_H$  entre -80 y -70 mV (figura 2.8).

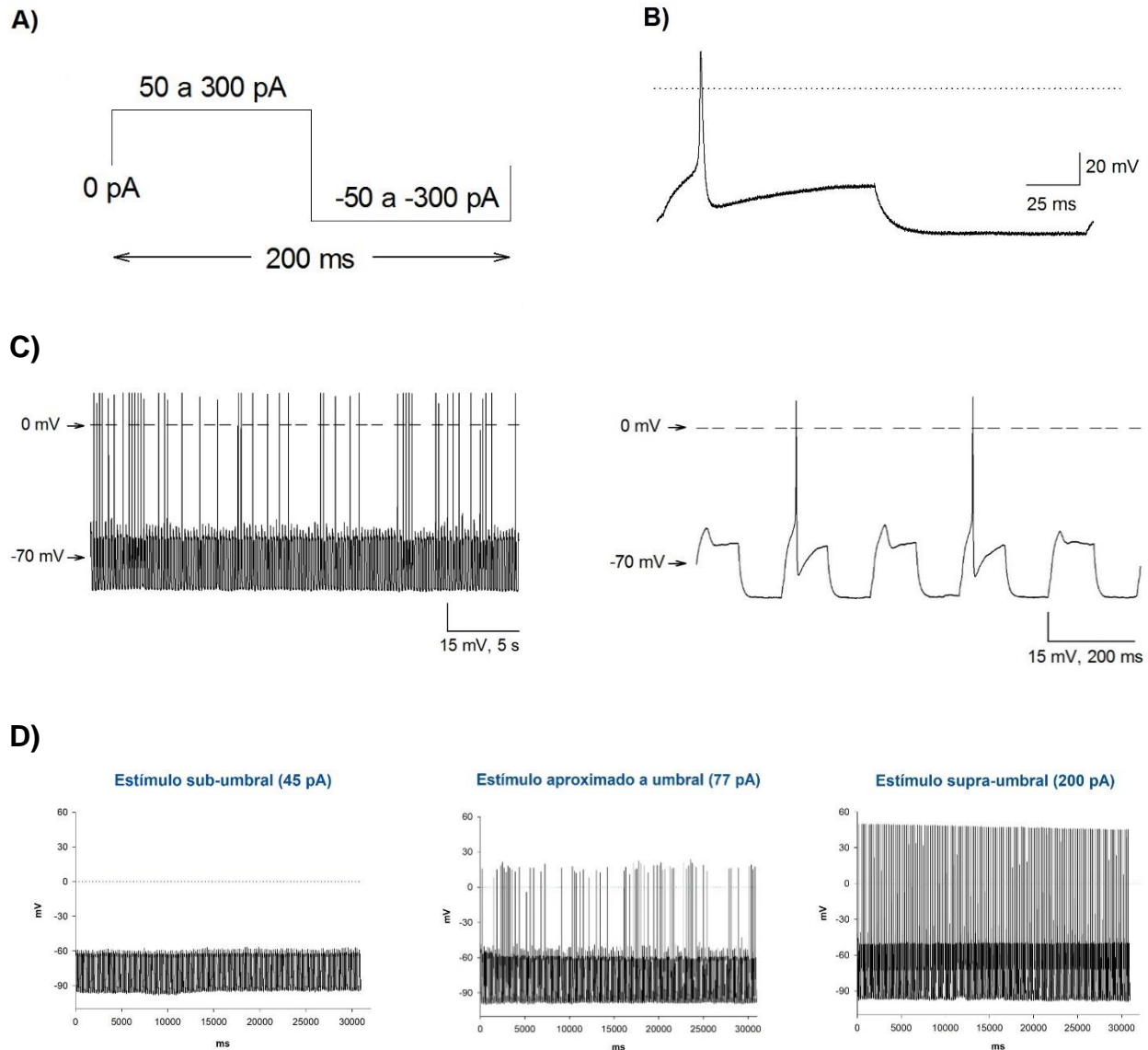
### Análisis de datos

Se registraron las propiedades pasivas: capacitancia de membrana ( $C_m$ ), resistencia de membrana ( $R_m$ ), constante de tiempo ( $\tau$ ), así como la resistencia de acceso ( $R_a$ ), el voltaje de membrana ( $V_m$ ) y la corriente de mantenimiento (Hold) de las NAV. Se obtuvo el promedio y el error estándar (ES) de todos los parámetros.

Para medir el efecto de altas concentraciones de  $K^+$  y el efecto del fármaco ML297 en las corrientes iónicas de NAV, se evaluó la diferencia de la corriente al inicio y el final de los protocolos de *voltajes hiperpolarizantes* (figura 2.7). Se hicieron gráficas de corriente contra voltaje (I-V), con promedio y ES.

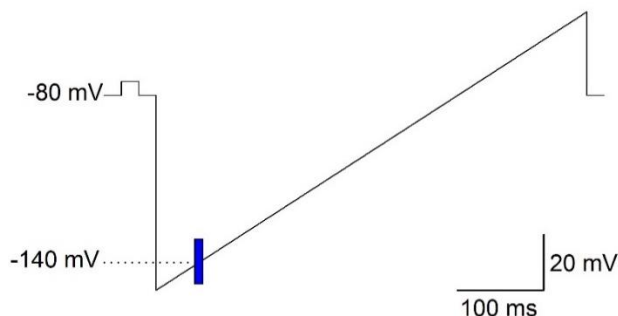


**Figura 2.7. Análisis de los protocolos de voltajes hiperpolarizantes.** En azul se representa la medición al inicio y al final de la corriente para obtener la diferencia que se analizará en ambos protocolos de *voltajes hiperpolarizantes*.



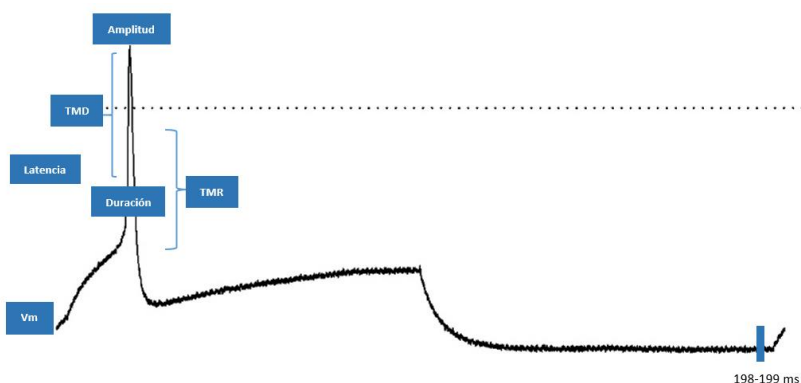
**Figura 2.8. Protocolo tren de pulsos.** **A)** Protocolo *tren de pulsos* en fijación de corriente. El pulso mostrado se repite 150 veces. El estímulo fue distinto en cada célula para obtener descargas como las mostradas en C. **B)** Trazo representativo del protocolo mostrado en A. **C)** Trazo representativo donde se muestran PA aproximadamente en el 50 % de la estimulación y una ampliación del proceso. **D)** Trazos representativos de las respuestas de las NAV dependiendo de la estimulación.

Con el protocolo de *rampa* se evaluó el efecto de los alcoholes en las corrientes iónicas en el  $V_m$  de -140 mV (figura 2.9). Y se hicieron gráficas del curso temporal de la corriente, con promedio y ES.



**Figura 2.9. Análisis del protocolo de rampa.** En azul se representa el voltaje en el cual, una vez alcanzado, se midió el valor de la corriente iónica.

Para evaluar el efecto de los alcoholes y del péptido opioide se utilizó el *tren de pulsos* y se analizó el  $V_m$  ante la estimulación hiperpolarizante entre 198 ms y 199 ms (*figura 2.10*). En cada PA se analizó: el  $V_m$ , amplitud, latencia al pico, duración al 50%, tasa máxima de despolarización (TMD) y la tasa máxima de repolarización (TMR), además se contabilizaron el número de PA y la frecuencia de PA por ciclo. Se graficaron los promedios con ES.



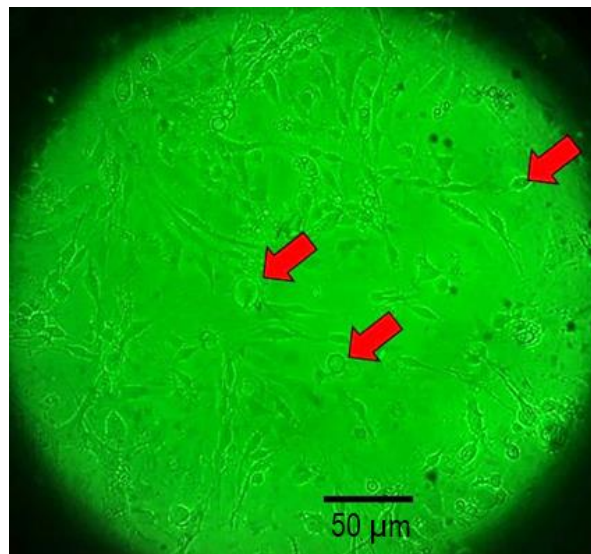
**Figura 2.10. Análisis del protocolo de pulsos cuadrados.** En azul se representan las mediciones del PA y del  $V_m$  en la estimulación hiperpolarizante.

Se determinó la similitud o diferencia significativa de cada parámetro haciendo análisis con la prueba estadística *T de Student pareada*, con  $\alpha = 0.05$ , utilizando los programas Clampfit 10.7, Excel 2013, SigmaPlot 11.0 y OriginPro 8.

RESULTADOS

1. Propiedades pasivas de las NAV

Realizamos registros electrofisiológicos de fijación de voltaje y fijación de corriente en la modalidad de célula completa en 44 NAV de ratas de 28 a 30 días y 24 NAV de ratas de 7 a 10 días (*figura 3*). En la tabla 3 se muestran las propiedades de las NAV registradas. La capacitancia de membrana de las NAV de 7 a 10 días fue de  $21.5 \pm 1.3$  pF y para las NAV de ratas de 28 a 30 días fue de  $25.7 \pm 1.7$  pF (*figura 3.1*).

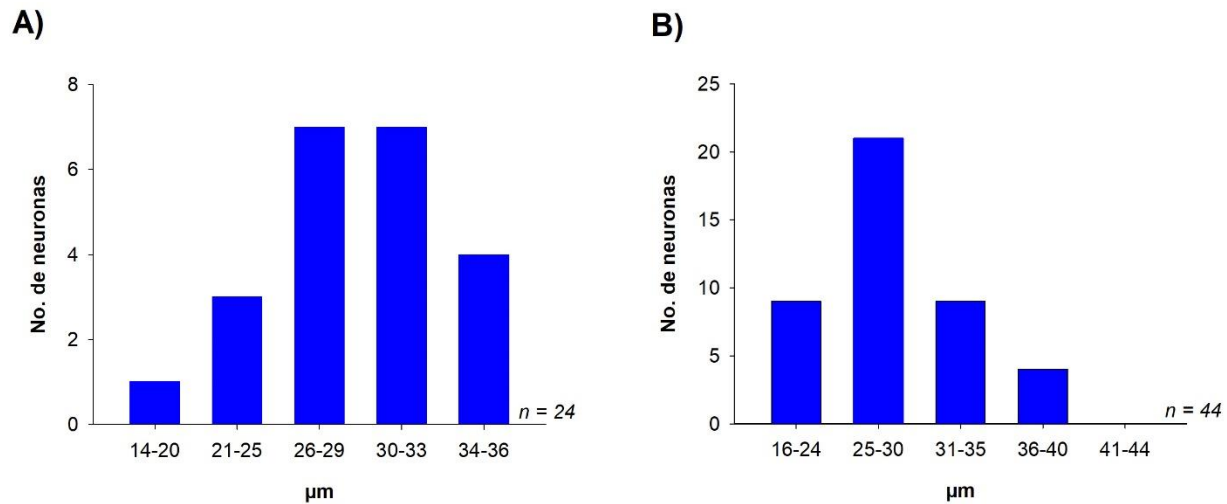


**Figura 3.** Fotografía de contraste de fases de NAV en cultivo primario. Las flechas indican células que probablemente sean NAV.

**Tabla 3.** Propiedades pasivas, Ra, Hold y  $V_m$  de las NAV.

	NAV de 28 a 30 días	NAV de 7 a 10 días
<b>N</b>	44	24
<b>Cm (pF)</b>	$25.7 \pm 1.7$	$21.5 \pm 1.3$
<b>Rm (MΩ)</b>	$168.1 \pm 33.3$	$315.1 \pm 29.2$
<b>Ra (MΩ)</b>	$4.1 \pm 0.6$	$8.9 \pm 0.8$
<b>Tau (μs)</b>	$113.2 \pm 24.4$	$194.6 \pm 23.3$
<b>Hold (pA)</b>	$-159.3 \pm 50.9$	$14.9 \pm 16.7$
<b><math>V_m</math> (mV)</b>	$-52.3 \pm 7.2$	$-61.7 \pm 1.6$



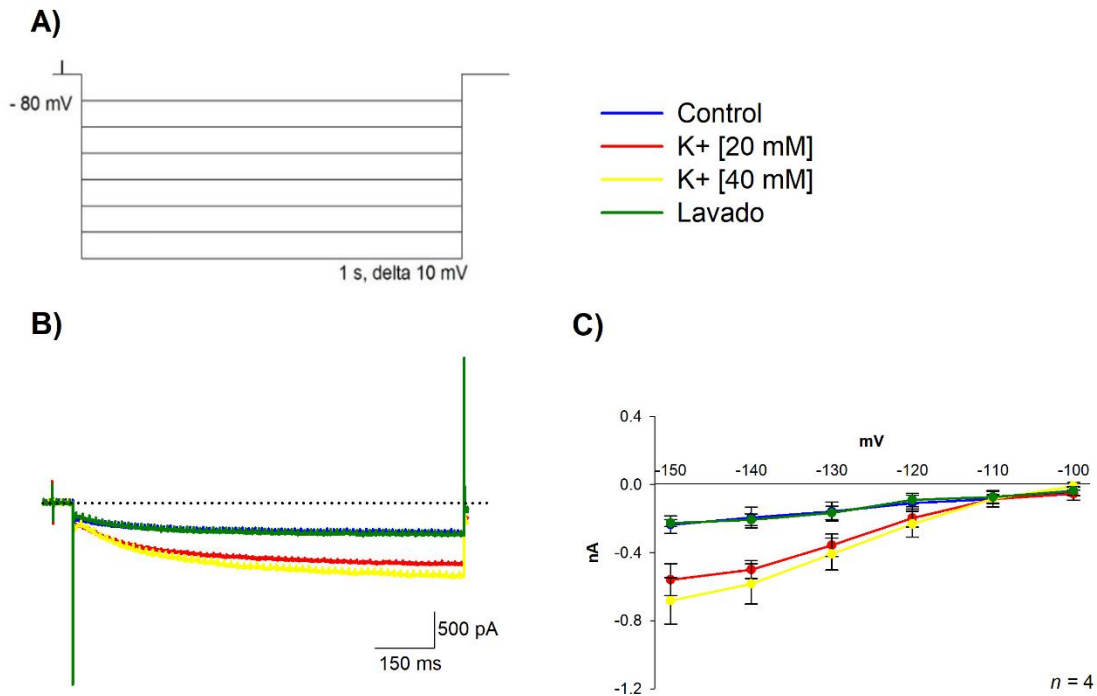


**Figura. 3.1. Diámetro de NAV con respecto a la capacitancia específica de la membrana. A)** Diámetro de NAV de 7 a 10 días. El rango del diámetro fue de 14 a 36  $\mu\text{m}$  con un promedio de  $26 \pm 6$   $\mu\text{m}$ . **B)** Diámetro de NAV de 28 a 30 días. El rango del diámetro fue de 16 a 44  $\mu\text{m}$  con un promedio de  $29 \pm 7$   $\mu\text{m}$ .

## 2. Evidencia de la corriente GIRK en NAV, con protocolos de fijación de voltaje.

### a. Con altas concentraciones de $\text{K}^+$

Para evidenciar la presencia de los canales GIRK primero utilizamos soluciones con concentraciones altas en  $\text{K}^+$ . Se aplicaron soluciones extracelulares a [20 mM] y [40 mM] de  $\text{K}^+$ , en el protocolo de pulsos de voltajes hiperpolarizantes (figura 2.4) en 4 NAV de 7 a 10 días. En la figura 3.2 se presentan los trazos representativos de la corriente iónica registrada durante la aplicación de  $\text{K}^+$  a altas concentraciones y se muestra la gráfica de corriente contra voltaje. Con la aplicación de soluciones con alto  $\text{K}^+$  se observa un incremento en la corriente a partir del voltaje de -120 mV ( $\text{K}^+$  [20 mM],  $n = 4$ ,  $p = 0.03$ ;  $\text{K}^+$  [40 mM],  $n = 4$ ,  $p = 0.09$ ), para -130 mV ( $\text{K}^+$  [20 mM],  $p = 0.01$ ;  $\text{K}^+$  [40 mM],  $p = 0.02$ ), para -140 mV ( $\text{K}^+$  [20 mM],  $p = 0.0004$ ;  $\text{K}^+$  [40 mM],  $p = 0.01$ ) y para -150 mV ( $\text{K}^+$  [20 mM],  $p = 0.01$ ;  $\text{K}^+$  [40 mM],  $p = 0.02$ ), existiendo una relación lineal negativa entre el  $V_m$  y la corriente de  $\text{K}^+$  de las NAV.



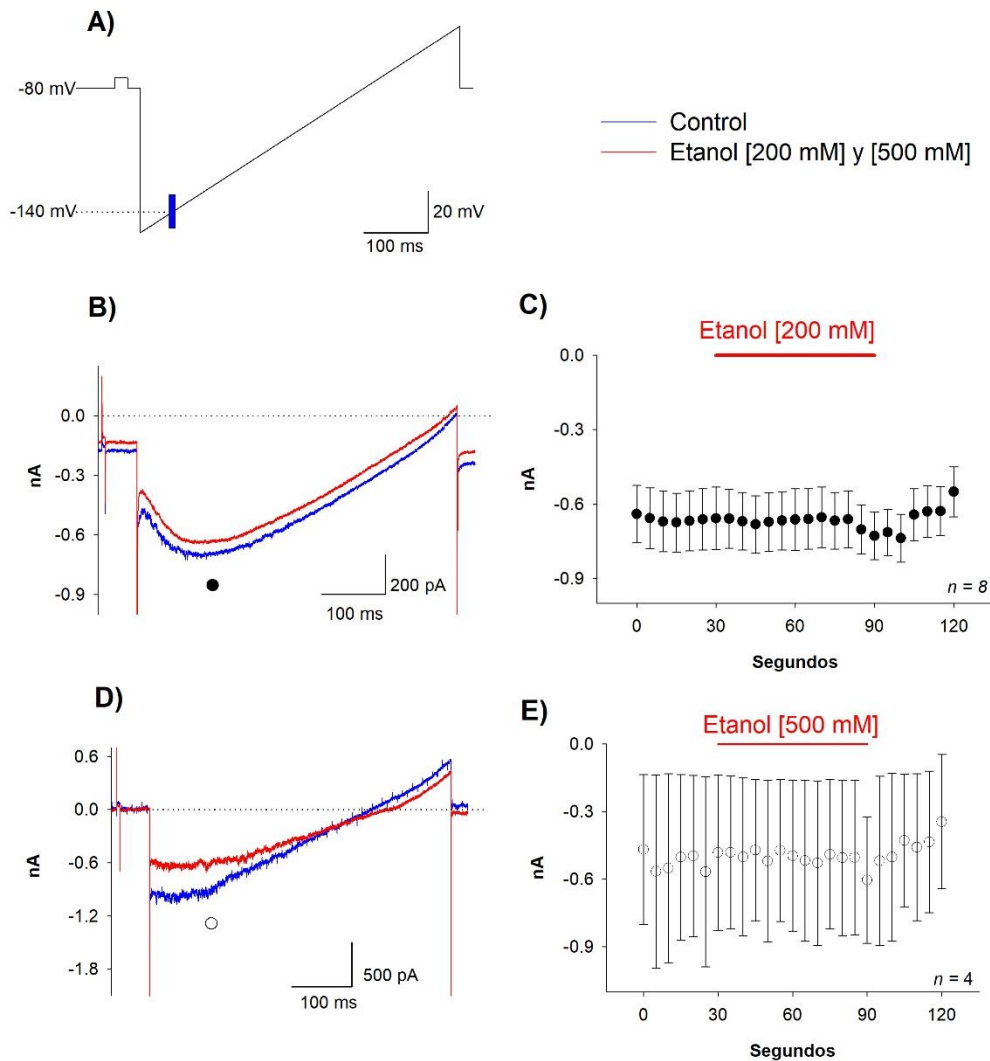
**Figura 3.2. Corriente de K<sup>+</sup> durante la aplicación de [20 mM] y [40 mM] de K<sup>+</sup> en el protocolo de voltajes hiperpolarizantes.** **A)** Protocolo de voltajes hiperpolarizantes utilizado en esta serie experimental. **B)** Trazo representativo de la corriente de K<sup>+</sup> de una NAV estimulada con -140 mV. La línea punteada simboliza 0 nA. **C)** Relación I-V del promedio con ES de la diferencia de cada estímulo durante las aplicaciones de alto K<sup>+</sup>, en 4 NAV. Existe un incremento significativo de la I<sub>K+</sub> a partir de -120 mV para ambas concentraciones de K<sup>+</sup> [20 mM] y [40 mM].

**b. Ante aplicación de alcoholes**

En esta serie experimental decidimos evidenciar la presencia de la corriente GIRK en las NAV mediante la aplicación de los alcoholes isopropanol [100 mM] y [1 M], butanol [100 mM] y [1 M], y etanol [200 mM] y [500 mM] utilizando el protocolo de rampa (figura 2.5).

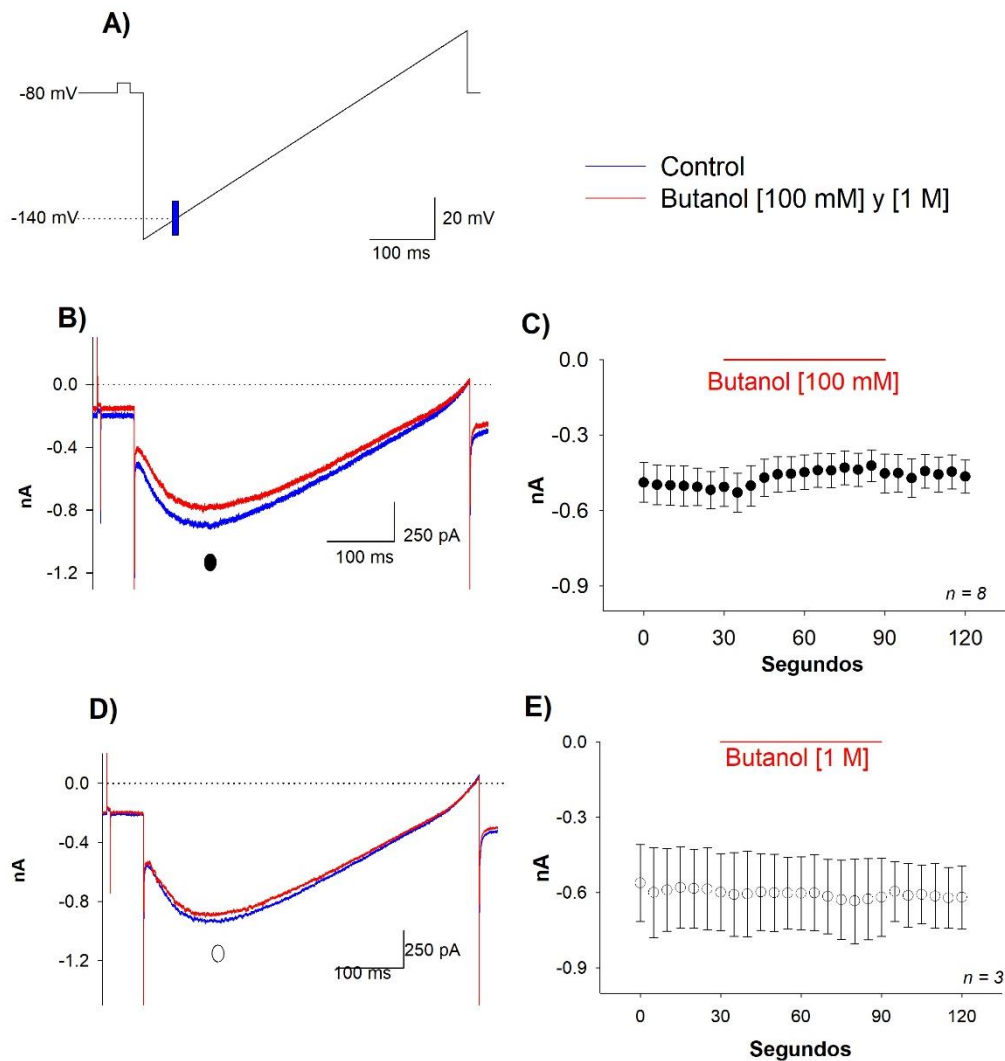
El efecto del etanol fue evaluado en la corriente asociada al voltaje de -140 mV debido a que se comprobó anteriormente que en este voltaje se presenta la corriente activada por hiperpolarización, presentando los valores más bajos de *p*. La aplicación de etanol no modificó significativamente la corriente en ambas concentraciones ([500 mM], *n* = 4, *p* = 0.66; [200 mM], *n* = 8, *p* = 0.43) (figura 3.3). Así como la aplicación de butanol tampoco

modificó significativamente la corriente en ambas concentraciones ([100 mM],  $n = 8$ ,  $p = 0.09$ ; [1 M],  $n = 3$ ,  $p = 0.33$ ) (figura 3.4). La aplicación de isopropanol [100 mM] no modificó significativamente la corriente ( $n = 10$ ,  $p = 0.83$ ) sin embargo a la concentración de 1 M aumentó el  $59 \pm 29$  % de la corriente con respecto al control ( $n = 8$ ,  $p = 0.05$ ) (figura 3.5). Estos datos sugieren que en las NAV, la corriente GIRK podría estar presente.

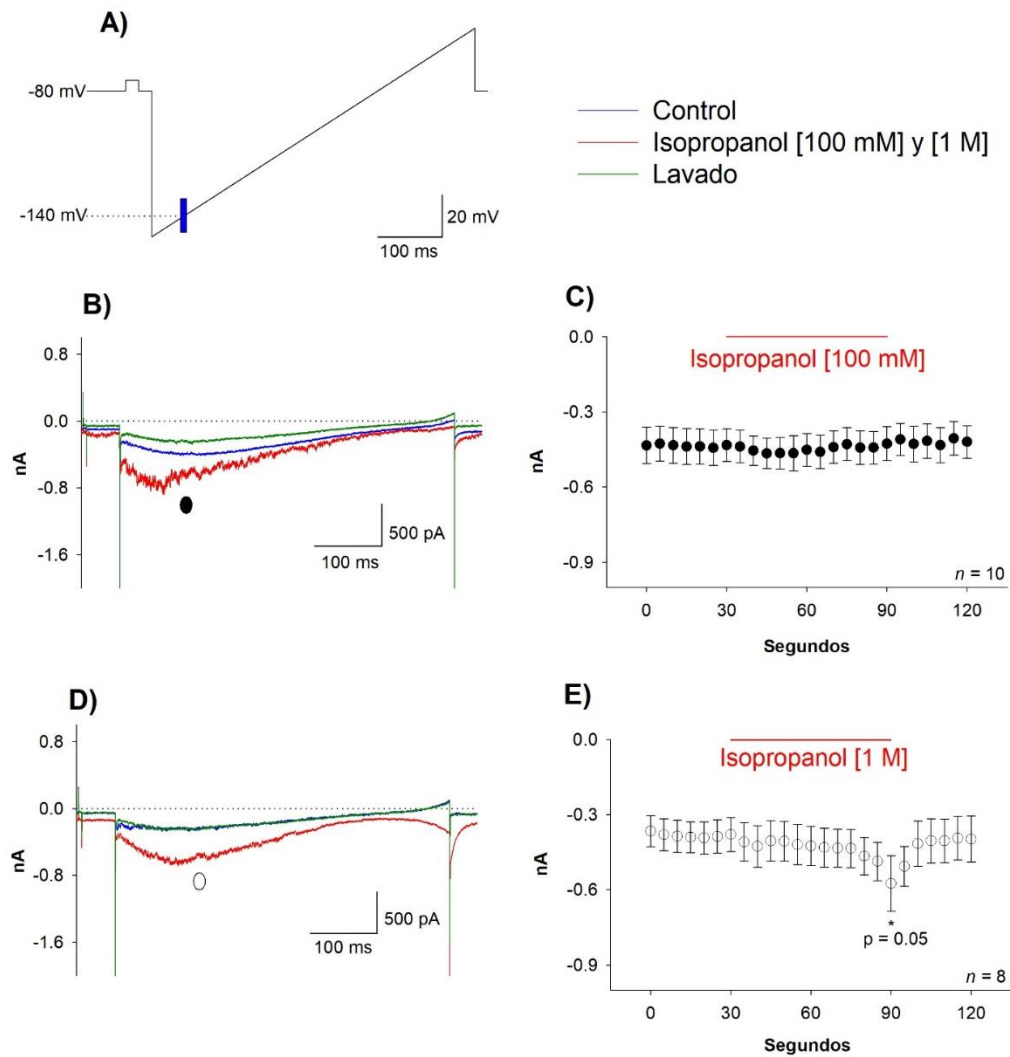


**Figura 3.3. Corriente iónica de NAV durante la aplicación de etanol en el protocolo de rampa. A)** Protocolo de rampa utilizado en esta serie experimental, la marca azul representa el voltaje de -140 mV donde fueron obtenidos los datos. **B)** y **D)** Trazos representativos de la corriente iónica de una NAV con aplicación de etanol [200 mM] y [500 mM] respectivamente. El punto sobre los trazos simboliza los -140 mV. **C)** y **E)** Curso temporal de la corriente, control por 30 segundos, aplicación de etanol durante 1

minuto y el lavado por 30 segundos. Cada punto representa el promedio con ES. El etanol en ambas concentraciones no mostró un efecto significativo, [500 mM]:  $p = 0.66$ , [1 M]:  $p = 0.43$ .



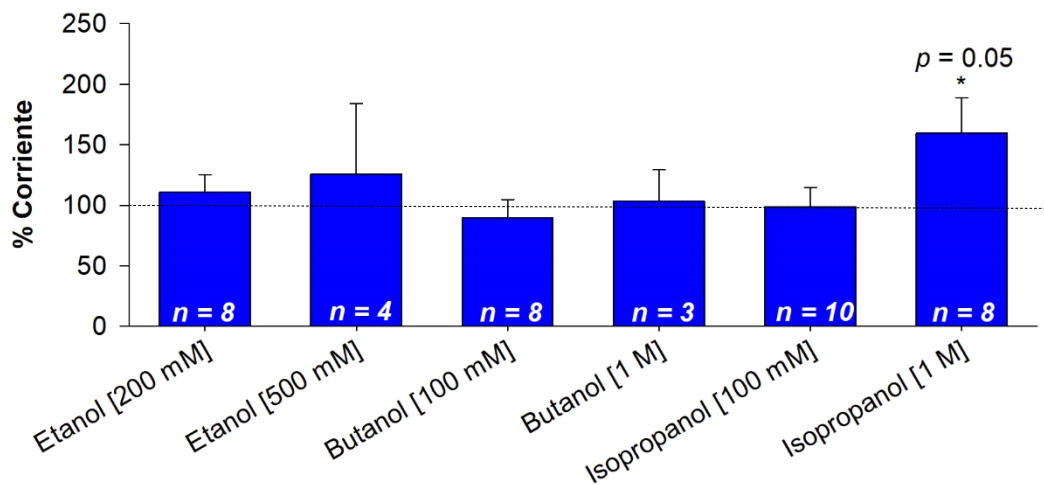
**Figura 3.4. Corriente iónica de NAV durante la aplicación de butanol en el protocolo de rampa. A)** Protocolo de rampa utilizado en esta serie experimental, la marca azul simboliza el voltaje de -140 mV donde fueron obtenidos los datos. **B) y D)** Trazos representativos de la corriente iónica de una NAV con aplicación de butanol [100 mM] y [1 M] respectivamente. El punto sobre los trazos simboliza los -140 mV. **C) y E)** Curso temporal de la corriente, control por 30 segundos, aplicación de butanol durante 1 minuto y el lavado por 30 segundos. Cada punto representa el promedio con ES. El butanol en ambas concentraciones no mostró un efecto significativo, [100 mM]:  $p = 0.09$ , [1 M]:  $p = 0.33$ .



**Figura 3.5. Corriente iónica de NAV durante la aplicación de isopropanol en el protocolo de rampa.** **A)** Protocolo de rampa utilizado en esta serie experimental, la marca azul simboliza el voltaje de -140 mV donde fueron obtenidos los datos. **B)** y **D)** Trazos representativos de la corriente iónica de una NAV con aplicación de isopropanol [100 mM] y [1 M] respectivamente. El punto sobre los trazos simboliza los -140 mV. **C)** y **E)** Curso temporal de la corriente, control por 30 segundos, aplicación de isopropanol durante 1 minuto y el lavado por 30 segundos. Cada punto representa el promedio con ES. Isopropanol a [100 mM] no mostró un efecto significativo,  $p = 0.83$ , sin embargo a la concentración de [1 M] sí mostró un efecto significativo con respecto al control, incrementando la amplitud  $59 \pm 29$  % de la corriente  $p = 0.05$ .

En la figura 3.6 se presenta un concentrado del efecto de los alcoholes en la corriente producida ante estímulos hiperpolarizantes en una gráfica del porcentaje de cambio de la corriente iónica en el voltaje de -140 mV. La aplicación de etanol y butanol cada uno

en dos concentraciones no modificaron significativamente la corriente iónica (etanol: [500] mM,  $n = 4$ ,  $10.7 \pm 14.5 \%$ ; [200 mM],  $n = 8$ ,  $25.3 \pm 58.4 \%$ ), (butanol: [100 mM],  $n = 8$ ,  $-10.6 \pm 15.2 \%$ ; [1 M],  $n = 3$ ,  $3.2 \pm 25.9 \%$ ). La aplicación de isopropanol [100 mM] no modificó la corriente ( $n = 10$ ,  $-1.3 \pm 15.7 \%$ ), sin embargo la aplicación de isopropanol [1 M] sí incrementó la corriente significativamente ( $n = 8$ ,  $59.5 \pm 29.3 \%$ ).



**Figura 3.6. Porcentaje de cambio en la corriente iónica de NAV con aplicación de alcoholes.** La aplicación de etanol ([500 mM],  $10.7 \pm 14.5 \%$ ; [200 mM],  $25.3 \pm 58.4 \%$ ), butanol ([100 mM],  $-10.6 \pm 15.2 \%$ ; [1 M],  $3.2 \pm 25.9 \%$ ) e isopropanol a [100 mM] ( $-1.3 \pm 15.7 \%$ ) no modificaron significativamente la corriente. Sin embargo, isopropanol [1 M] sí incrementó significativamente la corriente en  $59.5 \pm 29.3 \%$ .

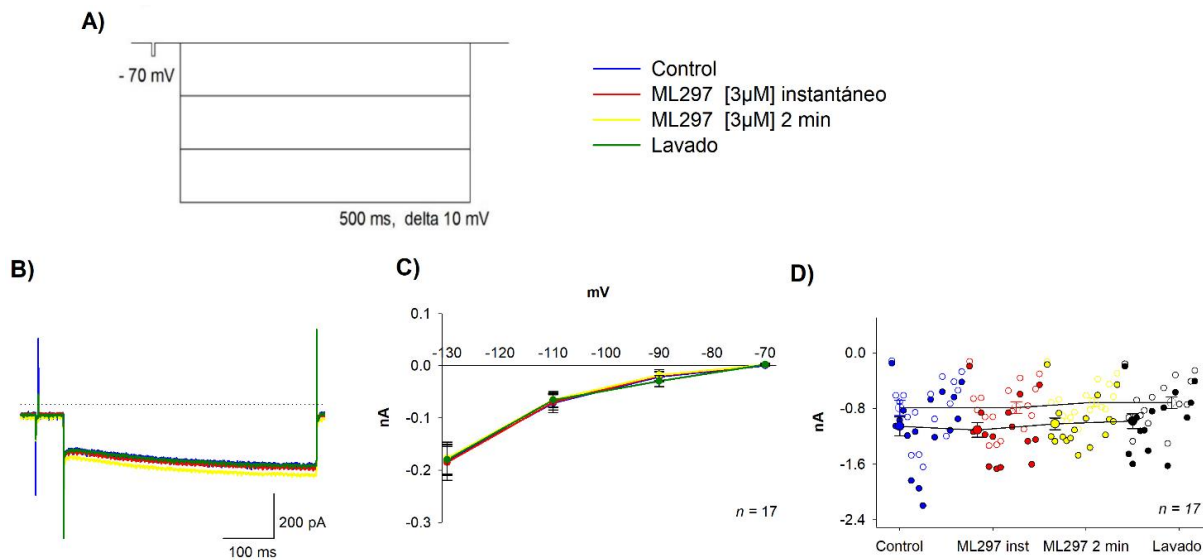
### c. Con ML297.

El fármaco ML297 es un agonista que activa a los canales GIRK1/2 y GIRK1/4 (Kaufmann, et al., 2013; Huang, et al., 2018) bajo la hipótesis de que al menos una subunidad del canal GIRK debe ser GIRK1, utilizamos dicho activador para evidenciar la corriente.

En esta serie experimental aplicamos el agonista ML297 [3  $\mu$ M] con el protocolo de pulsos de voltajes hiperpolarizantes (figura 2.4) utilizando soluciones normales (tabla 1) en 17 NAV de 28 a 30 días. El fármaco ML297 se aplicó de manera instantánea y después de

2 minutos para observar si hay cambios dependiendo el tiempo aunque se conoce que ML297 es un activador directo de los canales GIRK.

La aplicación de ML297 [3 $\mu$ M] no modificó significativamente la corriente en el voltaje de -70 mV ( $p = 0.55$ ), -90 mV ( $p = 0.67$ ), -110 mV ( $p = 0.55$ ) y -130 mV ( $p = 0.62$ ) (figura 3.7).

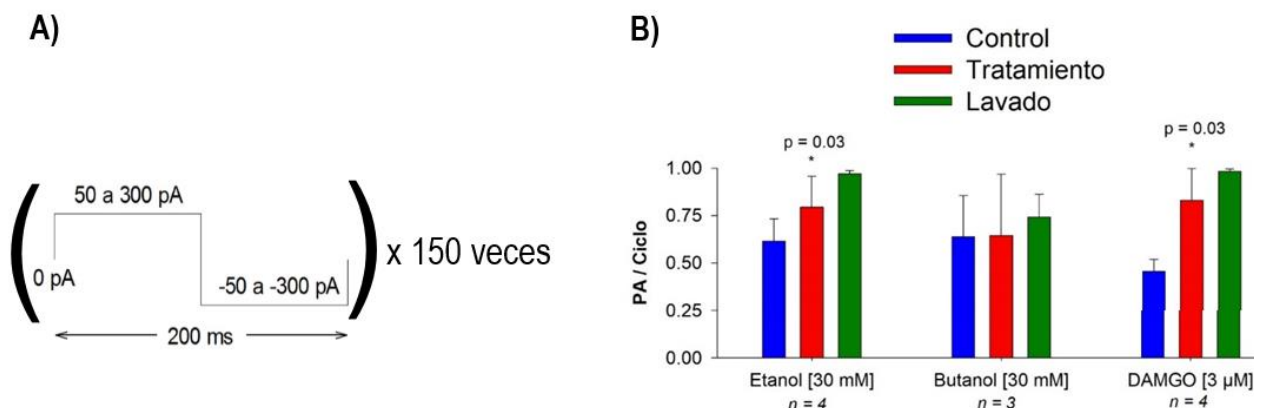


**Figura 3.7. Corriente iónica durante la aplicación de ML297 [3  $\mu$ M] en el protocolo de voltajes hiperpolarizantes. A)** Protocolo de voltajes hiperpolarizantes utilizado en esta serie experimental. **B)** Trazo representativo de la corriente iónica de una NAV estimulada con -130 mV durante la aplicación de ML297 [3  $\mu$ M]. La línea punteada simboliza el 0 nA. **C)** Gráfica I-V de la diferencia entre el final y el inicio de la corriente iónica de las NAV, sin cambios significativos entre el control y ML297 [3  $\mu$ M]. **D)** Dispersión en la amplitud de la corriente iónica en las cuatro condiciones experimentales. Cada punto representa la corriente de una célula. Los puntos sin relleno corresponden al  $V_m$  de -110 mV mientras que los puntos rellenos corresponden al  $V_m$  de -130 mV. ML297 [3  $\mu$ M] no modificó significativamente la corriente ni en la aplicación instantánea (-110 mV,  $p = 0.90$ ; -130 mV,  $p = 0.52$ ) ni después de la aplicación por 2 minutos (-110 mV,  $p = 0.22$ ; -130 mV,  $p = 0.69$ ) ( $n = 17$ ). La línea continua simboliza el promedio de la corriente al voltaje de -110 mV y la línea punteada representa el promedio al voltaje de -130 mV.

**3. Evidencia de la corriente GIRK en las NAV mediante la aplicación de alcoholes y del opioide en el protocolo de *tren de pulsos* para la descarga dinámica del PA.**

Evaluamos la respuesta en la descarga dinámica de los PA en NAV de 28 a 30 días con el protocolo de *tren de pulsos* (figura 2.6) ante la aplicación de etanol [30 mM], butanol [30 mM] y DAMGO [3 μM].

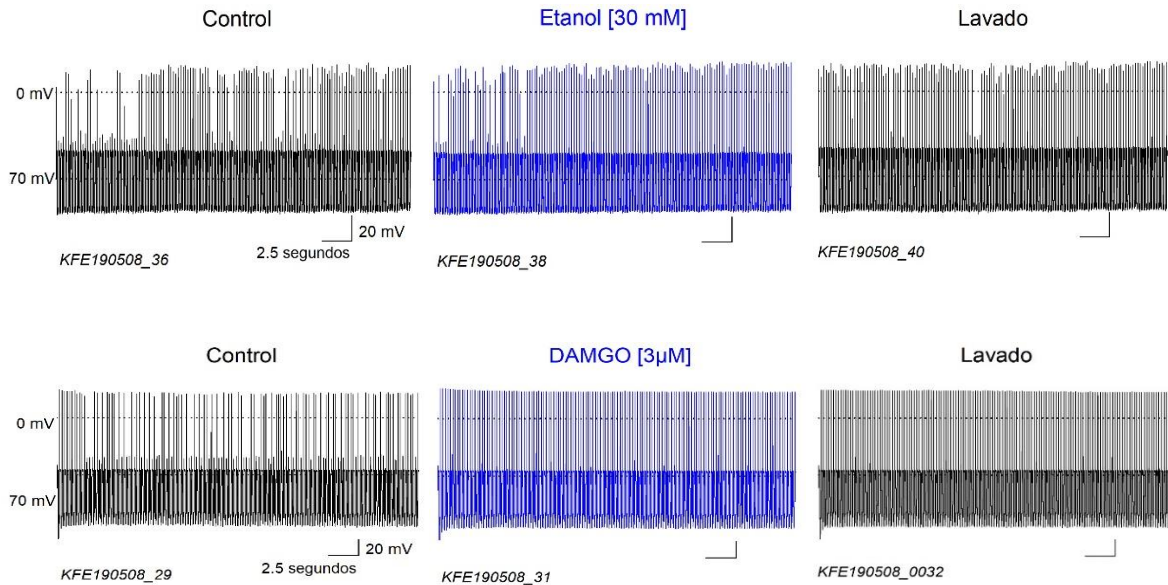
Para esta serie experimental el  $V_m$  en reposo promedio fue de  $-74.6 \pm 2.4$  mV y la estimulación para producir aproximadamente un PA por cada dos pulsos fue de  $248.9 \pm 40.5$  pA ( $n = 11$ ). La aplicación de etanol [30 mM] aumentó la descarga dinámica del PA un  $28 \pm 26\%$  con respecto al control ( $n = 4$ ,  $p = 0.03$ ), el lavado de 3 minutos no recuperó la descarga control (figura 3.8). La aplicación de butanol [30 mM] no modificó significativamente la descarga dinámica del PA ( $n = 3$ ,  $p = 0.99$ ) (figura 3.8). La aplicación de DAMGO [3 μM] aumentó la descarga dinámica de PA en  $82 \pm 36\%$  con respecto al control ( $n = 4$ ,  $p = 0.03$ ), el lavado no recuperó la descarga control (figura 3.8). En la figura 3.9 se muestran trazos representativos de la descarga dinámica de PA en condiciones control, con aplicación de etanol [30 mM] y DAMGO [3 μM] y el lavado, mostrándose el aumento de la frecuencia de descarga de los PA en ambos casos.



**Figura 3.8.** Descarga dinámica del PA de NAV, representada como PA / Ciclo, ante la aplicación de etanol [30 mM], butanol [30 mM] y DAMGO [3 μM]. **A)** Protocolo *tren de pulsos* utilizado en esta serie experimental. **B)** La aplicación de etanol [30 mM] y DAMGO [3 μM] aumentaron significativamente



el número de PA por ciclo con respecto al control ( $p = 0.03$ ,  $p = 0.03$  respectivamente), etanol aumentó el  $28 \pm 26\%$  mientras que DAMGO aumentó el  $82 \pm 36\%$  la descarga. La aplicación de butanol [30 mM] no modificó significativamente la descarga dinámica del PA ( $p = 0.99$ ). Los fármacos se aplicaron por 3 minutos, el lavado con etanol fue de 3 minutos y los lavados de butanol y DAMGO inmediatos.



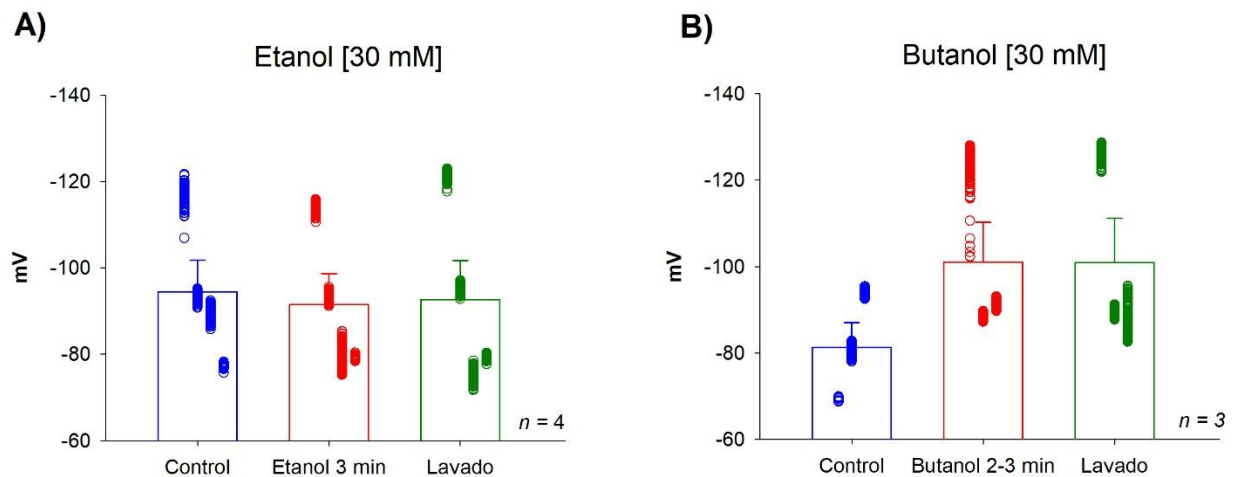
**Figura 3.9.** Trazos representativos de la descarga dinámica de los PA en las NAV, producidos con el protocolo de *tren de pulsos*, con aplicación de etanol [30 mM] y DAMGO [3 µM]. **A)** La aplicación de etanol [30 mM] aumentó el número de PA con respecto al control, el estímulo fue de 120 pA. **B)** La aplicación de DAMGO [3 µM] aumentó el número de PA con respecto al control, el estímulo fue de 600 pA. En ambas aplicaciones el lavado no recuperó la descarga control. La escala aplica para todos los trazos.

#### 4. Medición del voltaje de membrana en la fase hiperpolarizante del *tren de pulsos* como evidencia de la corriente GIRK en NAV.

##### a. Ante aplicación de alcoholes

Para evidenciar si la descarga dinámica de PA es influida por la corriente GIRK, evaluamos el efecto de alcoholes en la fase hiperpolarizante del *tren de pulsos* (figura 2.8) en 7 NAV de 28 a 30 días.

La aplicación de etanol [30 mM] no modificó significativamente el  $V_m$  de las NAV con respecto al control ( $n = 4$ ,  $p = 0.33$ ), tampoco la aplicación de butanol [30 mM] afectó significativamente el  $V_m$  de las NAV ( $n = 3$ ,  $p = 0.37$ ) (figura 3.10). El ajuste de  $V_m$  antes de la estimulación fue  $-74.9 \pm 3.1$  mV y la amplitud del estímulo fue de  $-225.7 \pm 31$  pA.



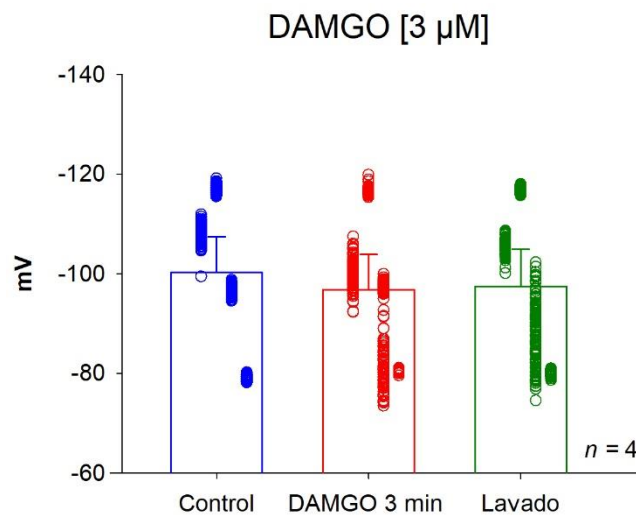
**Figura 3.10. Voltaje de membrana de las NAV, medido en la fase hiperpolarizante del protocolo de tren de pulsos, con aplicación de etanol [30 mM] y butanol [30 mM]. A)** Gráfica del  $V_m$  registrado en condiciones control, aplicación de etanol por 3 minutos y lavado de 2-3 minutos ( $n = 4$ ). **B)** Gráfica del  $V_m$  registrado en condiciones control, aplicación de butanol por 2-3 minutos y lavado inmediato ( $n = 3$ ). Los puntos representan el valor de cada neurona y las barras representan la media con ES en las tres condiciones. Ninguno de los dos alcoholes afectó significativamente el  $V_m$  hiperpolarizante con respecto al control (etanol [30 mM],  $p = 0.33$ ; butanol [30 mM],  $p = 0.37$ ).

### b. Ante aplicación del opioide

En diversas células como las AtT20, HEK-293, ovocitos de *Xenopus* spp transfectados y en neuronas del locus coeruleus se ha demostrado que la activación del receptor opioide afecta la corriente GIRK (Nagi y Pineyo, 2014; Lewohl, *et al.*, 1999; Raehal, Schmid, Groer y Bohn, 2011).

Se evaluó el efecto del agonista específico del receptor opioide  $\mu$ , DAMGO [3  $\mu$ M], sobre el  $V_m$  hiperpolarizante en el protocolo de *tren de pulsos* (figura 2.8) en NAV de 28 a 30 días. La aplicación de DAMGO no modificó significativamente el  $V_m$  hiperpolarizante ( $n$

=4,  $p = 0.24$ ) (figura 3.11). El ajuste de  $V_m$  antes de la estimulación fue  $-74.3 \pm 4.3$  mV y la amplitud del estímulo fue de  $-289.5.70 \pm 104.1$  pA.

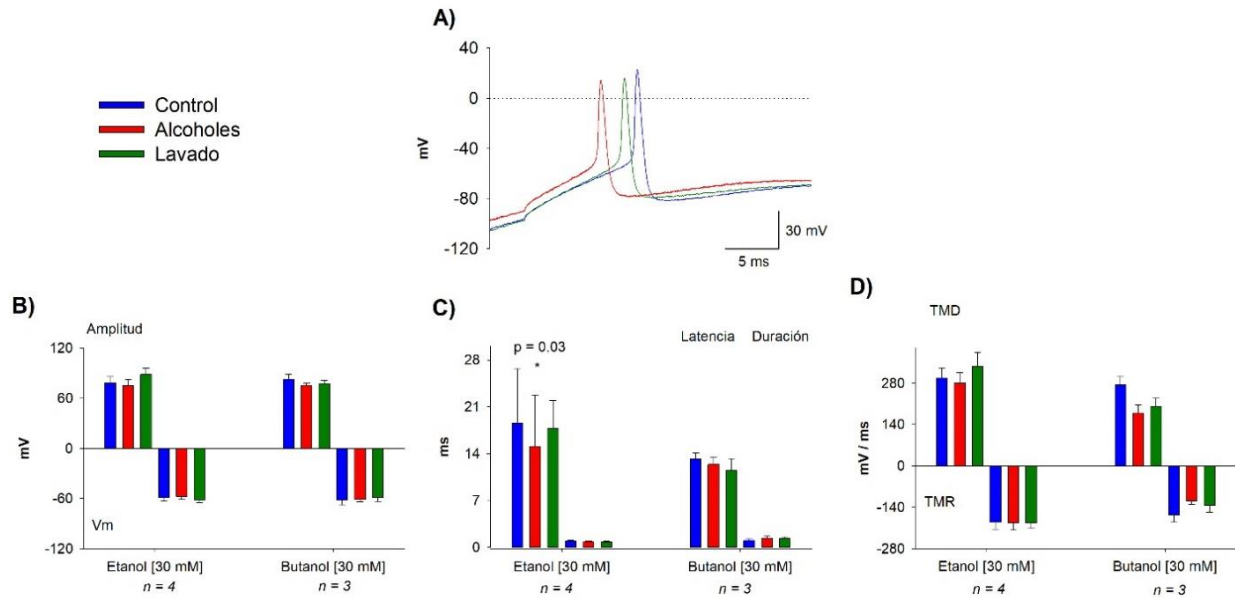


**Figura 3.11.** Gráfica del  $V_m$  en las NAV, medido en la fase hiperpolarizante del protocolo de *tren de pulsos*, con aplicación de DAMGO [3 µM]. Gráfica del  $V_m$  registrado en condiciones control, aplicación de DAMGO por 3 minutos y lavado inmediato ( $n = 4$ ,  $p = 0.24$ ). Los puntos representan el valor de cada neurona y las barras representan la media con ES en las tres condiciones.

## 5. Análisis de los parámetros del PA ante la aplicación de los tratamientos.

### a. Ante la aplicación de alcoholes

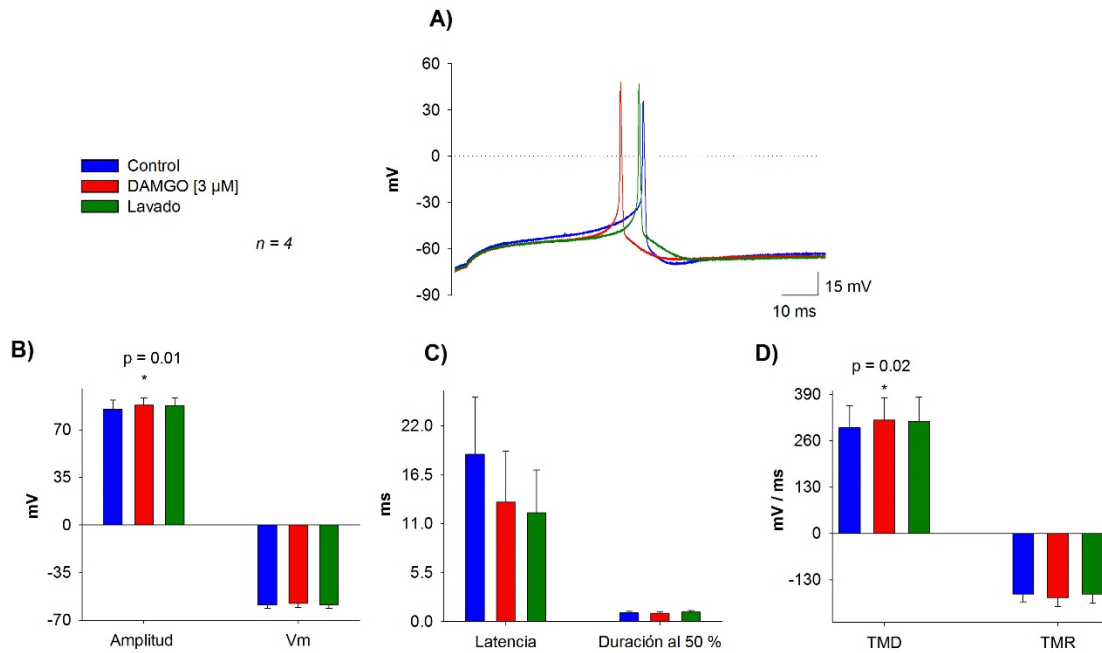
La aplicación de etanol [30 mM] disminuyó significativamente la latencia al pico con respecto al control en  $1.87 \pm 5.88\%$ , de  $18.55 \pm 8.17$  mV a  $15.07 \pm 7.63$  mV ( $n = 4$ ,  $p = 0.02$ ), sin modificar significativamente el resto de los parámetros (amplitud:  $p = 0.57$ , duración media:  $p = 0.10$ , TMD:  $p = 0.40$ , TMR:  $p = 0.25$  y  $V_m$ :  $p = 0.45$ ). La aplicación de butanol [30 mM] no modificó significativamente ningún parámetro del PA ( $n = 3$ , amplitud:  $p = 0.16$ , latencia al pico:  $p = 0.35$ , duración media:  $p = 0.80$ , TMD:  $p = 0.12$ , TMR:  $p = 0.54$  y  $V_m$ :  $p = 0.29$ ) (figura 3.12).



**Figura 3.12. Parámetros del PA en NAV durante la aplicación de alcoholes en el protocolo de *tren de pulsos*.** **A)** Trazos representativos de PA en una NAV en condiciones control, aplicación de etanol y lavado. **B)** Gráfica de barras de la amplitud y Vm, sin cambios significativos (etanol [30 mM]:  $p = 0.57$  y butanol [30 mM]:  $p = 0.16$ ). **C)** Gráfica de barras de la latencia al pico y duración media del PA. Cuando se aplicó etanol [30 mM], la latencia disminuyó significativamente con respecto al control un  $1.87 \pm 5.88\%$  ( $p = 0.02$ ), sin embargo la latencia con butanol [30 mM] no cambió ( $p = 0.35$ ). En cuanto a la duración media no se encontraron cambios significativos con ambos alcoholes. **D)** Gráfica de barras de la TMD y TMR del PA, no hubo cambios significativos con la aplicación de los alcoholes y el control. La estimulación promedio fue de  $246 \pm 60$  pA. Las NAV fueron obtenidas de ratas de 28 a 30 días.

### b. Ante la aplicación del opioide

La aplicación de DAMGO [3  $\mu$ M] aumentó significativamente la amplitud del PA con respecto al control en  $3.35 \pm 6.41\%$ , de  $85.29 \pm 6.52$  a  $88.15 \pm 5.47$  mV ( $n = 4$ ,  $p = 0.01$ ), la TMD del PA también aumentó un  $7.14 \pm 21\%$ , de  $297.81 \pm 60$  mV / ms a  $318.22 \pm 63.50$  mV / ms ( $n = 4$ ,  $p = 0.02$ ). En cuanto al resto de los parámetros del PA no se produjeron cambios significativos (latencia al pico:  $p = 0.29$ , duración media:  $p = 0.08$ , TMR:  $p = 0.06$  y Vm:  $p = 0.81$ ) (figura 3.13).



**Figura 3.13. Parámetros del PA en NAV durante la aplicación de DAMGO [3 μM]. A)** Trazos representativos del PA. **B)** Gráfica de barras de la amplitud y V<sub>m</sub>. La aplicación de DAMGO [3 μM] aumentó significativamente la amplitud del PA un  $3.35 \pm 6.41\%$  con respecto al control ( $n = 4$ ,  $p = 0.01$ ), mientras que en el V<sub>m</sub> no hubo cambios significativos. **C)** Gráfica de barras de la latencia al pico y duración media del PA, sin cambios significativos entre DAMGO [3 μM] y el control. **D)** La aplicación de DAMGO [3 μM] generó un aumento significativo en la TMD del PA con respecto al control un  $7.14 \pm 21\%$  ( $p = 0.02$ ), sin embargo la TMR del PA no se afectó ( $p = 0.06$ ). La estimulación media fue de  $289.5 \pm 104.1$  pA. Las NAV fueron obtenidas de ratas de 28 a 30 días.

## DISCUSIÓN

En nuestros resultados encontramos que en las NAV con soluciones altas en  $K^+$  incrementa la corriente entrante activada por hiperpolarización. Lewohl, *et al.* (1999) demostraron la presencia de la corriente de  $K^+$  rectificante de entrada en neuronas granulosas cerebelares y en ovocitos de *X. laevis* sp transfectados, utilizando soluciones con alto  $K^+$ . Por lo cual estos resultados sugieren la presencia de la corriente GIRK, aunque no lo demuestran completamente. Por otro lado Almanza *et al.* (2012) caracterizaron en NAV la corriente HCN con altas concentraciones de  $K^+$ . La corriente HCN comparte características con la corriente GIRK, como la generación de corriente activada por hiperpolarización, activación lenta y sensibilidad a la concentración externa de  $K^+$ , cuando ellos aplican zetebradin (bloqueador específico de la corriente HCN) se bloquea el  $94 \pm 5\%$ , dejando un remanente del 6%. Sin embargo ellos no caracterizaron dicho componente por lo cual pensamos que en ese 6% podría estar presente la corriente GIRK. Nuestros experimentos no estuvieron encaminados a caracterizar el 6% de corriente sin bloquear por zetebradin, sino determinar la presencia de la corriente GIRK.

Nuestros resultados mostraron que en las NAV, isopropanol aumentó la corriente activada por hiperpolazación, lo cual sería otro indicador de la presencia de la corriente GIRK. Kobayashi, *et al.* (1999) y Lewohl, *et al.* (1999) demostraron que el propanol induce la corriente GIRK en ovocitos de *X. laevis* sp transfectados con las subunidades GIRK1/2 y GIRK1/4. Aunque isopropanol y propanol no comparten la misma estructura molecular, sí comparten el mismo número de carbonos, una característica fundamental en la interacción de la corriente GIRK con los alcoholes, pues los alcoholes de cadena larga no actuarían en el mismo sitio de acción de los alcoholes de cadena corta.

Otros autores demuestran que etanol y butanol pueden modular la corriente GIRK, sin embargo nosotros no encontramos efecto con la aplicación de estos alcoholes. El etanol en células HEK-293T puede activar a los canales GIRK2 (Aryal, Dvir, Choe y Slesinger., 2009), mientras que en ovocitos de *X. laevis* sp transfectados puede activar a los canales GIRK1/2 y GIRK1/4 (Kobayashi, *et al.*, 1999; Lewohl, *et al.*, 1999). Además Lewohl, *et al.* (1999) demuestran que etanol aumenta la corriente producida por alto  $K^+$  a través de las

subunidades GIRK1, 2 y 4, ya sean expresadas como canales heteroméricos o como homómeros. El butanol en ovocitos de *X. laevis* sp activa los canales GIRK1/2 (Kobayashi, *et al.*, 1999) e inhibe los canales GIRK1/4 (Kobayashi, *et al.*, 1999; Lewohl, *et al.*, 1999). Si las NAV expresaran las subunidades GIRK1/4 sería factible que mostraran un efecto neto nulo ante la aplicación de butanol, aunque nuestros experimentos no estuvieron encaminados a evidenciar las posibles subunidades de los canales responsables de la corriente GIRK.

Dado que el agonista ML297 es un activador específico de la corriente GIRK (Kaufmann, *et al.*, 2013; Huang, *et al.*, 2018; Wydeven, *et al.*, 2014), se procedió a utilizarlo para definir la presencia de los canales GIRK. Kaufmann, *et al.* (2013) determinaron que en células HEK293, ML297 activa los canales GIRK1/2 y GIRK1/4, y no modula el canal homómero GIRK2 ni el canal GIRK2/3. En neuronas hipocámpales, Huang, *et al.* (2018) muestran en que ML297 es un agonista específico de GIRK1 (se une a los residuos F137 y D173) y de GIRK2 (se une a los residuos S148 y N184). Teniendo en cuenta que los canales GIRK pueden estar constituidos por la combinación de las subunidades GIRK1, GIRK2, GIRK3 y GIRK4 (Lewohl, *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2007; Mark y Herlitze, 2000), es factible que ML297 no sea agonista de todas las combinaciones posibles de canales GIRK funcionales. En nuestros registros la aplicación de ML297 no modificó la corriente, lo cual indica al menos la ausencia de los canales GIRK1/2 y GIRK1/4 en las NAV, teniendo en cuenta que no se descarta la posibilidad de que el resto de las subunidades estén presentes.

Dado que los canales GIRK hiperpolarizan a la membrana celular y disminuyen la excitabilidad neuronal (Lüscher y Slesinger, 2010), evaluamos su participación en la descarga dinámica de PA en las NAV. En nuestros resultados la aplicación de etanol aumentó la descarga dinámica del potencial de acción con respecto al control; Lewohl, *et al.* (1999) muestran que la activación de los canales GIRK por etanol genera que el potencial de membrana se acerque más al potencial de equilibrio del potasio, por lo cual al estar menos hiperpolarizada la célula, es factible un aumento de la excitabilidad. También se ha demostrado que la exposición crónica al etanol en neuronas de la corteza orbitofrontal genera hiperexcitabilidad. Sugiriendo que el etanol puede inducir cambios

en el agotamiento o desacoplamiento de las interacciones GIRK-PIP<sub>2</sub>, ya que se ha demostrado que la modulación de etanol sobre los canales GIRK es sensible a PIP<sub>2</sub> (Nimitvilai, Lopez, Mulholland y Woodward, 2017; Xiao, Zhen y Yang, 2003)

La activación de receptores a opioides modula la corriente GIRK en diversas células (Kobayashi, *et al.*, 1999; Nagi y Pineyo, 2014; Lewohl, *et al.*, 1999; Raehal *et al.*, 2011; Stötzner, Spahn, Celik, Labuz y Machelska, 2018), por lo cual decidimos evaluar el efecto de la activación del receptor  $\mu$ , sobre la descarga dinámica de PA como evidencia de la presencia de la corriente GIRK. Nagi y Pineyo (2014) muestran que los agonistas MOR y DOR silencian a las interneuronas GABAérgicas del hipocampo mediante la hiperpolarización de las interneuronas locales, lo cual está correlacionado con el bloqueo de los canales GIRK y otros canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje. Así mismo diversos autores han reportado que la activación del receptor opioide  $\mu$  conduce a la activación de los canales GIRK (Lewohl, *et al.* 1999; Kobayashi, *et al.*, 1999; Raehal *et al.*, 2011; Nagi y Pineyo, 2014). En nuestros resultados la aplicación de DAMGO (agonista opioide  $\mu$ ) aumentó la descarga dinámica del PA en las NAV. Una explicación de que tanto DAMGO como etanol aumenten la descarga de PA, es que ambos potencien la corriente GIRK, por lo cual la neurona estaría menos hiperpolarizada y con ello más susceptible a llegar al umbral de disparo, sin descartar que ambos fármacos pueden modular otros canales iónicos como los de sodio, potasio, cloro (Medina, 2006; Modig, 2013) y calcio tipo T, L y N (Raehal *et al.*, 2011; Seseña *et al.*, 2014).

Los canales GIRK, en otras células, provocan una hiperpolarización de 3-5 mV en el potencial de reposo (Huang, *et al.*, 2018; Kobayashi, *et al.*, 1999; Lewohl, *et al.*, 1999), sin embargo, esto no fue evaluado en nuestras series experimentales, dado que antes de la estimulación con trenes de pulsos, siempre se ajustó manualmente al mismo V<sub>m</sub>. Durante el análisis de la fase hiperpolarizante del *tren de pulsos* en las NAV, determinamos que la aplicación de etanol, butanol y DAMGO no modificaron dicho voltaje hiperpolarizante. Se ha demostrado que el efecto analgésico de los opioides a nivel periférico en neuronas sensoriales, está relacionado con la activación de los canales GIRK (Nagi y Pineyo, 2014), sin embargo, nosotros no observamos cambios significativos al respecto, esto también podría deberse al ajuste inicial que hicimos del V<sub>m</sub>. Otra posible



explicación de la ausencia de efecto en el voltaje hiperpolarizante es la ausencia de canales en la configuración GIRK1/2 (Kobayashi, *et al.*, 1999).

Durante el análisis de los parámetros del PA, la aplicación de etanol disminuyó la latencia sin modificar el resto de los parámetros. Deducíamos que esta modificación en la latencia se debe a una alteración por parte del etanol en los canales de  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , sin embargo en trabajos previos la modificación en los canales iónicos se efectúa en su mayoría en concentraciones mayores a la utilizada. En terminales neurohipofisarias el etanol a concentraciones en el rango de 10 y 25 mM reduce corrientes de  $\text{Ca}^+$  tipo L, mientras que a la concentración de 50 mM, también reduce corrientes de  $\text{Ca}^+$  tipo T y N (Treisman *et al.*, 1991). También se conoce que a concentraciones agudas, el etanol disminuye la función de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa (Medina, 2006). Covarrubias y Rubin (1993) y Treisman *et al.* (1991) determinaron que el etanol afecta los canales de  $\text{K}^+$ , evaluaron un total de 14 canales y notaron efectos en diferentes grados pero a  $[\geq 200 \text{ mM}]$ . Pensamos que etanol también podría modificar otros canales  $\text{K}_{\text{ir}}$  pero la evidencia reportada por Lewohl, *et al.* (1999) y por Kobayashi, *et al.* (1999) muestra que etanol no activa otros canales como IRK1, IRK3, ROMK1, ROMK2 y ROMK3.

La aplicación del agonista opioide DAMGO [ $3 \mu\text{M}$ ] aumentó significativamente la amplitud y la TMD del PA, sin modificar el resto de los parámetros. Seseña *et al.* (2014) determinaron que en NAV, DAMGO inhibe la  $I_{\text{Ca}}$  (tipo T, L y N) de una manera dependiente de la concentración, así mismo determinaron que con estimulación sinusoidal el efecto de agonistas opioides  $\mu$  puede ser potenciador o inhibidor, así que en aquellas neuronas con una mayor densidad de  $I_{\text{K, Ca}}$ , la inhibición de la  $I_{\text{Ca}}$  conduce a un aumento de la excitabilidad. Sin embargo no descartamos la posible presencia de la  $I_{\text{GIRK}}$  debido a la evidencia del acoplamiento funcional de MOR y los canales GIRK, expresándose de manera consistente en neuronas sensoriales periférica de ratas, ratones y de humanos (Nockemann, *et al.*, 2013, Stötzner *et al.*, 2018).

Raehal *et al.* (2011) en sus estudios realizados con células AtT20, con neuronas del locus coeruleus y con neuronas del ganglio trigémino, muestran que DAMGO induce una desensibilización rápida de la inhibición de canales de  $\text{Ca}^+$  dependientes de voltaje e induce desensibilización de la activación del canal GIRK. Por lo tanto los cambios

generados en la amplitud y en la TMD del PA pueden deberse a la activación de canales de Na<sup>+</sup> y canales de Ca<sup>+</sup> dependientes de voltaje.

El objetivo de este trabajo era evidenciar la presencia de la corriente GIRK en NAV utilizando moduladores como alcoholes y el agonista opioide DAMGO, con quienes se ha demostrado en otras células que activan los canales GIRK. Sin embargo evidenciar la presencia de la corriente GIRK en las NAV ha sido un proceso difícil, a pesar de esto, nuestros resultados muestran características que podrían sugerir la presencia de los canales GIRK en las NAV. Aunque se esperaba la expresión funcional de los canales GIRK y en particular GIRK1/2 o GIRK1/4 en las NAV debido a que la subunidad GIRK1 es la más común en el cerebro, y por el registro de que estos canales están asociados con la activación por etanol y por GPCR, es posible que se estén expresando otras conformaciones como los canales GIRK2/4, GIRK1/4 y el homómero GIRK2 (Nagi y Pineyo, 2014; Lewohl, *et al.*, 1999; Kaufmann, *et al.*, 2013; Kobayashi, *et al.*, 1999; Huang, *et al.*, 2018). Cada una de estas distintas combinaciones de subunidades bajo las que se estén expresando funcionalmente los canales GIRK representan un factor limitante en nuestro trabajo debido a que se ha señalado que cada canal GIRK homómero y heterotetrámero muestran potencias y eficacias distintivas dependiendo de su conformación estructural, del modulador y de la expresión diferencial entre tejidos. Por lo tanto no se descarta la presencia de los canales GIRK en las NAV.

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren la presencia de la corriente GIRK en las NAV, pero no pudimos demostrarlo contundentemente. Resultados como el aumento de la corriente activada por hiperpolarización ante la aplicación de isopropanol [1 mM] y el aumento en la frecuencia de descarga ante la aplicación de etanol y DAMGO, son consistentes con la presencia de la corriente GIRK; sin embargo la falta de efecto ante la aplicación del agonista selectivo ML297 y la falta de cambio en el  $V_m$  hiperpolarizante en el *tren de pulsos* ante la aplicación de alcoholes y opioides, también sugieren que la corriente no está presente.

## REFERENCIAS

- Almanza, A. (2001). *Corrientes iónicas en células ciliadas de órganos otolíticos y canales semicirculares del axolotl* (Tesis de maestría). Instituto de Fisiología BUAP, Puebla, México.
- Almanza, A., Luis, E., Mercado, F., Vega, R. y Soto, E. (2012). Molecular identity, ontogeny, and cAMP modulation of the hyperpolarization-activated current in vestibular ganglion neurons. *J Neurophysiol*, 108(8), 2264-2275. doi: 10.1152/jn.00337.2012
- Álvarez, Y. y Farré, M. (2005). Farmacología de los opioides. *Adicciones*, 17(2), 21-40.
- Aryal, P., Dvir, H., Choe, S. y Slesinger, P. A. (2009). A discrete alcohol pocket involved in GIRK channel activation. *Nat Neurosci*, 12(8), 988-995. doi: 10.1038/nn.2358.
- Bear, M. F., Connors, B. W. y Paradiso, M. A. (2016). *Neurociencia exploración del cerebro (4 ed.)*. Barcelona, España: Wolters Kluwer.
- Benito-Orejas, J. I., Valda-Rodrigo, J. y Vielba-Varea, J. A. (2018). Revisión sobre el nistagmo posicional. *Rev ORL*, 9(2), 105-110. doi: 10.14201/orl.17190
- Binetti, A. C. (2015). Fisiología vestibular. *Revista faso*, 1,14-21. Recuperado de [www.faso.org.ar](http://www.faso.org.ar)
- Cervantes, B., Vega, R., Limón, A. y Soto, E. (2013). Identity, expression and functional role of the sodium-activated potassium current in vestibular ganglion afferent neurons. *Neuroscience*, 14(240), 163-175. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.02.052
- Chávez, H., Vega, R. y Soto, E. (2005). Histamine (H3) receptors modulate the excitatory amino acid receptor response of the vestibular afferent. *Brain Research*, 1064, 1-19. doi: 10.1016/j.brainres.2005.10.027
- Covarrubias, M. y Rubin, E. (1993). Ethanol selectively blocks a noninactivating K<sup>+</sup> current expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci*, 90, 6957-6960. doi: 10.1073/pnas.90.15.6957

- Eatock, R. A. y Songer, J. E. (2011). Vestibular hair cells and afferents: two channels for head motion signals. *Annu Rev Neurosci*, 34, 501-34. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113710
- Eatock, R. A., Xue, J. y Kalluri, R. (2008). Ion channels in mammalian vestibular afferents may set regularity of firing. *The Journal of Experimental Biology*, 211, 1764-1774. doi: 10.1242/jeb.017350
- Esparza-Rangel, E., Rodríguez-Sánchez, D. N. y Benavidez-Insignares, E. H. (2013). Síndrome vestibular por accidente cerebrovascular asociado a hipotiroidismo secundario. *Spei Domus*, 9(19), 57-63. doi: 10.16925/sp.v9i19.710
- Flores, A., Galicia, S. y Gómez, G. O. (2001). El sistema vestibular: aspectos generales y neurodesarrollo. En J. Velázquez. (Ed). , *Temas selectos de neurociencias II* (pp. 179-208). Ciudad de México, México: UAM-PUIS.
- Franco-Gutiérrez, V. y Pérez-Vázquez, P. (2013). Vértigo y nistagmo posicional por etanol mecanismo de flotación cupular. *Rev Soc Otorrinolaringol*, 4(4), 14-20.
- Gao, X., Zhang, H., You, Z., Lu, C. y He, C. (2007). G Protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in dorsal root ganglion neurons. *Acta Pharmacol Sin*, 28(2), 185-190. doi: 10.1111/j.1745-7254.2007.00478.x
- Gutiérrez-Márquez, A., Jáuregui-Renaud, K., Viveros-Renteria, L. y Villanueva-Padrón, L. A. (2005). Discapacidad por enfermedad auditiva y vestibular en un centro de atención especializada. *Gac Méd Méx*, 141(2), 105-110.
- Hernández-Delgadillo, G. P. y Cruz, S. L. (2005). Mecanismos de tolerancia analgésica a los opioides. *Salud Mental*, 28(3), 22-31.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2014). Concepción o elección del diseño de investigación. *Metodología de la investigación* (6 ed). (pp. 141-148). México, DF: McGraw-Hill/ Interamericana editores, S. A. DE C. V.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I. y Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*, 90, 291-366. doi: 10.1152/physrev.00021.2009

- Horishita, T. y Harris, R. A. (2008). *n*-Alcohols Inhibit Voltage-Gated Na<sup>+</sup> Channels Expressed in *Xenopus* Oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 336(1), 270-277. doi: 10.1124 / jpet.108.138370
- Huang, Y., Zhang, Y., Kong, S., Zang, K., Jiang, S., Wan, L., Chen, L.,... Wang, Y. (2018). GIRK1-mediated inwardly rectifying potassium current suppresses the epileptiform burst activities and the potential antiepileptic effect of ML297. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101, 362-370. doi: 10.1016/j.biopha.2018.02.114
- Iwasaki, S., Chihara, Y., Komuta, Y., Ito, K. y Sahara, Y. (2008). Low-voltage-activated potassium channels underlie the regulation of intrinsic firing properties of rat vestibular ganglion cells. *J Neurophysiol*, 100(4), 2192-204. doi: 10.1152/jn.01240.2007
- Jamon, M. (2014). The development of vestibular system and related functions in mammals: impact of gravity. *Front Integr Neurosci*, 8 (11), 1-13. doi: 10.3389/fnint.2014.00011
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. y Jessell, T. M. (2001). El cerebelo. En E. R. Kandel (Ed.), *Principios de neurociencia (4 ed.)* (pp. 832-852). España: McGraw-Hi.
- Kanjhan, R., Coulson, E. J., Adams, D. J. y Bellingham, M. C. (2005). Tertiapin-Q blocks recombinant and native large conductance K<sup>+</sup> channels in a use-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther*, 314(3), 1353-1361. doi: 10.1124/jpet.105.085928
- Kaufmann, K., Romaine, I., Days, E., Pascual, C., Malik, A., Yang, L.,... Weaver, C. D. (2013). ML297 (VU0456810), the first potent and selective activator of the GIRK potassium channel, displays antiepileptic properties in mice. *ACS Chem Neurosci*, 4(9), 1278-1286. doi: 10.1021/cn400062a
- Kobayashi, T., Ikeda, K., Kojima, H., Niki, H., Yano, R., Yoshioka, T. y Kumanishi, T. (1999). Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Nature Neuroscience*, 2(12), 1091-1097. doi: 10.1038/16019

- Kornilova, L. N., Temnikova, V. V., Naumov, I. A. y Solovieva, A. D. (2011). Treatment of patients with vértigo an balance disorders. *Neurosciece and Behavioral Physiology*, 41(1), 57-63. doi: 10.1007/s11055-010-9379-0
- Lewohl, J. M., Wilson, W. R., Mayfield, R. D., Brozowski, S. J., Morrisett, R. A. y Harris, R. A. (1999). G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels are targets of alcohol action. *Nature Neuroscience*, 2(12), 1084-1090. doi: 10.1038/16012
- Limón, A., Pérez, C., Vega, R. y Soto, E. (2005). Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> current density is correlated with soma size in rat vestibular-afferent neurons in culture. *J Neurophysiol*, 94(6), 3751-3761. doi: 10.1152/jn.00177.2005
- Lirola, A. G. (2010). *Registro posturográfico y craneocorpográfico de las alteraciones del equilibrio producidas por el alcohol* (Tesis de doctorado). Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Liu, X., Wooltorton, J., Gaboyard-Niay, S., Yang, F., Lysakowski, A., y Eatock, R. A. (2016). Sodium channel diversity in the vestibular ganglion: NaV1.5, NaV1.8, and tetrodotoxin-sensitive currents. *J Neurophysiol*, 115(5), 2536-2555. doi: 10.1152/jn.00902.2015.
- Lüscher, C. y Slesinger, P. A. (2010). Emerging concepts for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Nleurosci*, 11(51), 301-315. doi: 10.1038/hnrn2834
- Mark, M. D. y Herlitz, S. (2000). G-protein mediated gating of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem*, 267(19), 5830-5836. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01670.x
- Martín-Aragón, S. y Bermejo-Bescós, P. (2010). Vértigo tratamiento Farmacológico. *Offarm*, 29(1), 74-79.
- Medina, C. (2006). *Efecto del alcohol etílico sobre la actividad específica de aminopeptidasas reguladoras de neuropéptidos en neuronas y astrogliá en cultivo* (Tesis de doctorado). Universidad de Jaén, España.

- Mercado, F., López, I., Ortega, A., Almanza, A., Soto, E. y Vega, R. (2012). FMRamide-related peptide expression in the vestibular-afferent neurons. *Neurosci Lett*, 513(1), 12-16. doi: 10.1016 / j.neulet.2012.01.074
- Modig, F. (2013). *Effects of acute alcohol intoxication on human sensory orientation and postural control* (Tesis de doctorado). Universidad de Lund, Suecia.
- Nagi, K. y Pineyro, G. (2014). Kir3 channel signaling complexes: focus on opioid receptor signaling. *Frontiers in Cellular Neurosciencie*, 8(186), 1-15. doi: 10.3389/fncel.2014.00186
- Nichols, C. y Slesinger, P. (2017). *Inwardly rectifying potassium channels*. BPSGuía de farmacología, 1-7, recuperado de <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyintroductionForward?familyId=74>
- Nimitvilai, S., Lopez, M. F., Mulholland, P. J. y Woodward, J. J. (2017). Ethanol Dependence Abolishes Monoamine and GIRK (Kir3) Channel Inhibition of Orbitofrontal Cortex Excitability. *Neuropsychopharmacology*, 42, 1800–1812. doi: 10.1038/npp.2017.22
- Pérez, C., Limón, A., Vega, R. y Soto, E. (2009). The muscarinic inhibition of the potassium M-current modulates the action-potential discharge in the vestibular primary-afferent neurons of the rat. *Neuroscience*, 158(4), 1662-1674. doi: /10.1016/j.neuroscience.2008.11.023
- Pérez, C., Vega, R. y Soto, E. (2010). Phospholipase C-mediated inhibition of the M-potassium current by muscarinic-receptor activation in the vestibular primary-afferent neurons of the rat. *Neuroscience Letters*, 468(3), 238–242. doi: 10.1016/j.neulet.2009.11.004
- Pérez, M. U., Soto, E y Vega, R. (1991). Streptomycin blocks the postsynaptic effects of excitatory amino acids on the vestibular system primary afferents. *Brain Res*, 563(1-2), 221-226. doi: 10.1016/0006-8993(91)91537-B



- Prado, F., Macías, M. C., Guerrero M. T., Muñoz, A., Hernández, M. V. y Riva B. (2006). Mareos y vértigos. En SEGG (Ed.), *Tratado de geriatría para residentes* (pp. 467-479). Madrid, España: International Marketing & Communication, S.A.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A., Mcnamara, J. y Williams, S. M. (2012). Sistema vestibular (3 ed.). *Neurociencia* (pp. 345-367). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Raehal, K. M., Schmid, C. L., Groer, C. E. y Bohn, L. M. (2011). Functional selectivity at the  $\mu$ -opioid receptor: implications for understanding opioid analgesia and tolerance. *Pharmacol Rev*, 63(4), 1001-1019. doi: 10.1124/pr.111.004598
- Rico-Romero, B. Y., Ishiwara-Niembro, J. K. y Sánchez-Pérez, Y. (2012). Vértigo postural paroxístico benigno del canal semicircular horizontal (VPPB-CSH). *Rev Mex AMCAOF*, 1(2), 119-125.
- Roth, T. N., Weber, K. P., Wettstein, V. G., Marks, G. B., Rosengren, S. M. y Hegemann, S. C. (2014). Ethanol consumption impairs vestibulo-ocular reflex function measured by the video head impulse test and dynamic visual acuity. *Journal of Vestibular Research*, 24(4), 289-95. doi: 10.3233/VES-140520
- Sauma, J. y Villalobos, A. (2007). Manejo del vértigo en la medicina general. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica*, 64(579), 107-111.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2001). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y usos de los animales de laboratorio. SAGARPA.
- Seseña, E. (2009). *Modulación de la corriente de calcio por activación del receptor opioide  $\mu$  en neuronas aferentes vestibulares* (Tesis de maestría). Instituto de Fisiología BUAP, México.
- Seseña, E., Vega, R. y Soto, E. (2014). Activation of  $\mu$ -opioid receptors inhibits calcium-currents in the vestibular afferent neurons of the rat through a cAMP dependent

- mechanism. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(90), 1-15. doi: 10.3389/fncel.2014.00090
- Siegel, A. y Sapru, H. N. (2015). The neuron. En L. Pecarich. (Ed.), *Essential Neuroscience* (pp.47-95). Filadelfia, Estados Unidos de America: Wolters Kluwer.
- Soto, E. y Vega, R. (2010). Neuropharmacology of Vestibular System Disorders. *Curr Neuropharmacol*, 8(1), 26-40. doi: 10.2174 / 157015910790909511
- Soto, E., Chavéz, H., Valli, P., Benvenuti, C. y Vega, R. (2001). Betahistine produces post-synaptic inhibition of the excitability of the primary afferent neurons in the vestibular endorgans. *Acta Otolaryngol*, 545, 19–24. doi: 10.1080/000164801750388045
- Soto, E., Limón, A., Ortega, A. y Vega, R. (2002). Características morfológicas y electrofisiológicas de las neuronas del ganglio vestibular en cultivo. *Gac Méd Méx*, 138(1), 1-13. doi: 10.1152/jn.01240.2007
- Soto, E., Vega, R., y Seseña, E. (2013). Neuropharmacological basis of vestibular system disorder treatment. *Journal of Vestibular Research*, 23(3), 119-137. doi: 10.3233/VES-130494
- Soto, E., Flores, A., Eróstegui, C. y Vega, R. (1994). Evidence for NMDA receptor in the afferent synaptic transmission of the vestibular system. *Brain Res*, 633(1-2), 289-96. doi: 10.1016/0006-8993(94)91551-2
- Stötzner, P., Spahn, V., Celik, M. Ö., Labuz, D. y Machelska, H. (2018). Mu-opioid receptor agonist induces Kir3 currents in mouse peripheral sensory neurons – effects of nerve injury. *Front Pharmacol*, 19, 1478. doi: 10.3389/fphar.2018.01478
- Tascioglu, B.A. (2005). Brief review of vestibular system anatomy and its higher order projections. *Neuroanatomy*, 4, 24–27.
- Toyama, T., Kano, H., Mase, M., Yokogawa, M., Osawa, M. y Shimada, I. (2018). Structural basis for the ethanol action on G-protein–activated inwardly rectifying potassium channel 1 revealed by NMR spectroscopy. *National Academy of Sciences*, 115(15), 3858-3863. doi: 10.1073/pnas.1722257115

- Treisman, S. N., Bayley, H., Lemos, J. R., Wang, X. M., Nordmann, J. J. y Grant, A. J. (1991). Effects of ethanol on calcium channels, potassium channels, and vasopressin release. *Ann N Y Acad Sci*, 625, pp. 249-263. doi: 10.1111/j.1749-6632.1991.tb33844.x
- Vaamonde, P. (2001). *Relaciones entre las vías vestibuloocular y vestibuloespinal tras la estimulación vestibular* (Tesis de doctorado). Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Vázquez, M. I., Gómez, M. P. y Domínguez, M. (Sin fecha). *Síndromes vestibulares periféricos: enfermedad de Meniere, neuritis vestibular, vértigo posicional paroxístico benigno cirugía del vértigo*. Recuperado en noviembre de 2019 de <http://seorl.net/PDF/Otologia/035%20-%20S%C3%8DNDROMES%20VESTIBULARES%20PERIF%C3%89RICOS%20ENFERMEDAD%20DE%20MENIERE,%20NEURONITIS%20VESTIBULAR,%20V%C3%89RTIGO%20POSICIONAL%20PAROX%C3%8DSTICO%20BENIGNO.pdf>
- Vollrath, M. A., Kwan, K. Y. y Corey, D. P. (2007). The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Annu Rev Neurosci*, 30, 339–365. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112917
- Wydeven, N., Fernandez de Velasco, K. M., Du, Y., Benneyworth, M. A., Hearing, M. C., Fischer, R. A.,... Wickmana, K. (2014). Mechanisms underlying the activation of G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK) channels by the novel anxiolytic drug, ML297. *PNAS*, 111(29), 10755-10760. doi: 10.1073/pnas.1405190111
- Xiao, J., Zhen, X. G. y Yang, J. (2003). Localization of PIP2 activation gate in inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Nat Neurosci*, 6(8), 811–818. doi: 10.1038/nn1090

## ANEXOS

**Tabla 1. Soluciones para el registro electrofisiológico.**

SOLUCIÓN	CONTENIDO (mM)
Extracelular normal	140 NaCl, 5.4 KCl, 1.2 MgCl <sub>2</sub> , 1.8 CaCl <sub>2</sub> , 10 HEPES y 10 Dextrosa (pH 7.4 con KOH)
Extracelular [ $\uparrow$ K <sup>+</sup> ]	40 KCl, 105.4 NaCl, 1.2 MgCl <sub>2</sub> , 1.8 CaCl <sub>2</sub> y 10 HEPES (pH 7.4 con NaOH)
	20 KCl, 125.4 NaCl, 1.2 MgCl <sub>2</sub> , 1.8 CaCl <sub>2</sub> y 10 HEPES (pH 7.4 con NaOH)
Tyrode de fosfatos	118 NaCl, 2.5 KCl, 1 MgCl <sub>2</sub> , 2.5 CaCl <sub>2</sub> , 25 NaHCO <sub>3</sub> , 1 NaHPO <sub>4</sub> y 10 Dextrosa (pH 7.4 con HCl)
Intracelular normal	125 KCl, 10 NaCl, 0.134 CaCl <sub>2</sub> , 10 EGTA, 5 HEPES y 10 Dextrosa (pH 7.2 con KOH), adicionada con 1 mg/ml de ATPMg y 0.5 mg/ml de GTPNa.

**Tabla 2. Fármacos utilizados para el registro electrofisiológico.**

FÁRMACO	CONCENTRACIÓN
Etanol (Golden Bell).	[30 mM, 200 mM y 500 mM]
Butanol (Baker Analyzed)	[30 mM, 100 mM y 1 M]
Isopropanol (MEYER)	[100 mM y 1 M]
DAMGO (SIGMA®)	[3 $\mu$ M]
ML- 297 (SIGMA®)	[3 $\mu$ M]