



Cinvestav

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**Efecto de la concentración extracelular de sodio en la actividad
eléctrica de las neuronas magnocelulares del núcleo
supraóptico de la rata mediado por canales de sodio Na_x**

TESIS

Que presenta

Biól. Exp. Sandra Jocelin Salgado Mozo

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y
MOLECULAR

Director de tesis: Dr. Ubaldo García Hernández

Ciudad de México septiembre 2019

CÓMITE TUTORAL

Director de Tesis:

Dr. Ubaldo García Hernández

Profesor Titular

Investigador CINVESTAV 3C

Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN

ugarcia@fisio.cinvestav.mx

Asesor:

Dr. Jorge Noel Quevedo Durán

Profesor Titular

Investigador CINVESTAV 3B

Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN

jquevedo@fisio.cinvestav.mx

Asesora:

Dra. María del Refugio García Villegas

Profesora Titular

Investigador CINVESTAV 3C

Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN

rgarciav@fisio.cinvestav.mx

AGRADECIMIENTOS AL CONACyT

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 15 del departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

El Programa de Maestría en Ciencias con especialidad en Neurobiología Celular y Molecular pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 1875, en el Nivel Competencia Internacional y cuenta con apoyo del mismo Consejo. Número de CVU 861604.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Ubaldo García, por el tiempo dedicado a este trabajo; por su paciencia en la enseñanza; por compartir conocimiento; y por cultivarme no solamente en la ciencia.

A mis asesores, el Dr. Jorge Quevedo y la Dra. Refugio, por estar interesados en el tema y el tiempo dedicado a este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por recordarme que el Lunes existe.

A mis amigos de generación por su apoyo en la maestría y por las pláticas tan intensas e interesantes que tuvimos: Juan Carlos, Juan Manuel, Pao y Jesús.

A las pequeñas ratas que dieron su vida para este trabajo.

A mis papás por siempre apoyarme; aguantarme; y amarme como soy.

A mis 4 hermanas por escucharme y preguntar acerca del tema.

A mis sobrinos simplemente por existir.

Finalmente quiero agradecer a la vida por permitirme estar aquí.

GRACIAS

RESUMEN

La homeostasis de los fluidos extracelulares requiere de un balance entre la ingesta y excreción de Na^+ y agua. Esta dinámica es controlada por el complejo osmorreceptor central, el cual se encuentra formado por neuronas capaces de detectar los cambios osmóticos. Los núcleos supraóptico y paraventricular forman parte de este complejo. Sus productos de secreción, oxitocina y vasopresina, participan en el control osmótico de los fluidos extracelulares. Las neuronas magnocelulares de estos núcleos expresan canales catiónicos TRPV1 capaces de detectar cambios osmóticos. Además, expresan canales de Na^+ del tipo Na_x , que les confiere la capacidad de detectar cambios en la concentración extracelular de Na^+ .

En neuronas disociadas del núcleo supraóptico de la rata, y mediante el empleo de técnicas electrofisiológicas, determinamos que las soluciones hiperosmóticas con alta concentración de Na^+ extracelular provocan una despolarización de la membrana en ambas poblaciones de neuronas magnocelulares: oxitocinérgicas y vasopresinérgicas, misma que se asocia a una corriente entrante y a la disminución de la resistencia de entrada. Además, para distinguir entre el efecto hiperosmótico mediado por los canales TRPV1, y el efecto debido a la elevación del Na^+ extracelular, que se sugiere es mediado por los canales Na_x , utilizamos una solución isoosmótica e hipernatrémica que reproduce los efectos ya mencionados.

ABSTRACT

Homeostasis of extracellular fluids requires a balance between the intake and excretion of Na^+ and water. This dynamic is controlled by the central osmoreceptor complex, which is formed by neurons capable of sense osmotic changes. The supraoptic and paraventricular nuclei are part of this complex. Its secretion products, oxytocin and vasopressin, participate in the osmotic control of extracellular fluids. The magnocellular neurons of these nuclei express cationic TRPV1 channels capable of sense osmotic changes. In addition, they express Na^+ channels of the Na_x type, which gives them the ability to detect changes in the extracellular concentration of Na^+ .

In dissociated neurons of the rat supraoptic nucleus, and by means of electrophysiological techniques, we determined that hyperosmotic solutions with high concentration of extracellular Na^+ , cause a membrane depolarization in both population of magnocellular neurons: oxytocinergic and vasopressinergic, which is associated with an inward current and the decrease of the input resistance. In addition, to distinguish between the hyperosmotic effect mediated by the TRPV1 channels, and the effect due to the elevation of extracellular Na^+ , which is suggested to be mediated by the Na_x channels, we used an isoosmotic and hypernatremic solution that reproduces the effects before mentioned.

ÍNDICE

Índice	6
Abreviaciones	7
1 Introducción	8
1.1 Generalidades	8
1.2 Control de la osmolaridad	8
1.3 Núcleo supraóptico	11
1.4 Características electrofisiológicas de las neuronas del NSO	13
1.5 El NSO en el control de la osmolaridad	15
1.6 Canal Na _x	18
2 Antecedentes	20
3 Justificación	20
4 Pregunta de investigación	20
5 Hipótesis	20
6 Objetivos	21
7 Métodos	21
7.1 Disociación de las neuronas del NSO	21
7.2 Electrofisiología	22
7.2.1 Identificación de las neuronas del NSO	22
7.2.2 Estímulos hiperosmóticos	22
7.2.3 Curva de activación	23
7.2.4 Estímulo hipernatrémico isoosmótico	23
7.3 Análisis estadístico	23
8 Resultados	24

8.1 Obtención de las neuronas magnocelulares del NSO	24
8.2 Identificación de las neuronas magnocelulares del NSO	25
8.3 Estímulos hiperosmóticos	28
8.4 Curva de activación	32
8.5 Estímulo hipernatrémico isoosmótico	33
9 Discusión	35
10 Conclusión	38
11 Perspectivas	38
12 Bibliografía	39

ABREVIACIONES

OT Oxitocina

NSO Núcleo Supraóptico

NPV Núcleo Paraventricular

H-N Hipotálamo-Neurohipófisis

VP Vasopresina

SFO Órgano Subfornical

OVLTL Órgano Vascular de la Lámina Terminal

MnPO Núcleo Preóptico Medial

EPSP Potenciales postsinápticos excitadores

[Na⁺]_o Concentración extracelular de Na⁺

NTS Núcleo del Tracto solitario

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

El Na⁺ es el electrolito más abundante de los fluidos extracelulares y junto con sus aniones acompañantes (Cl⁻ y HCO₃⁻), determinan la osmolaridad. El incremento de la osmolaridad de los fluidos es un problema común que se debe principalmente a la disminución en el contenido de agua en el cuerpo y/o a la ingesta excesiva de Na⁺ (De Luca et al., 2014; Noda, 2007).

La osmorregulación es un proceso esencial para la función normal de las células. El control de la osmolaridad de los fluidos extracelulares es una dinámica entre la ingesta y excreción de sales y agua (Hussy et al., 2000; Squire et al., 2003). En mamíferos, la osmolaridad del fluido extracelular es mantenida cerca de los 300 mOsm (Bourque, 2008).

1.2 Control de la osmolaridad

El mecanismo de control de la osmolaridad se da principalmente a nivel central. Se han reportado dos estructuras esenciales para la regulación de la osmolaridad: el órgano subfornical (SFO) y el órgano vascular de la lámina terminal (OVLT), ambos pertenecen a los llamados órganos circunventriculares que se caracterizan por carecer de barrera hematoencefálica (Hussy et al., 2000; Squire et al., 2003). Estas estructuras envían conexiones directas tanto al núcleo supraóptico (NSO) como al núcleo paraventricular (NPV) para el control de la osmolaridad (Figura 1). Se ha reportado también una tercera estructura, el núcleo preóptico medial (MnPO) que envía sus proyecciones a las neuronas del NSO y del NPV luego de recibir aferencias del SFO y del OVLT (Hussy et al., 2000; Bourque et al., 1994).

El control de la osmolaridad también se da a nivel periférico debido a la presencia de neuronas sensoriales localizadas en el tracto gastrointestinal, la vena porta hepática y el hígado. Estas neuronas periféricas envían sus proyecciones a núcleo del tracto solitario (NTS). Finalmente, las neuronas del NTS influyen directa o indirectamente (a través del MnPO) en la actividad de las neuronas del NSO por cambios en la osmolaridad a nivel periférico (Figura 1) (Hussy et al., 2000; Choe & Bourque, 2015).

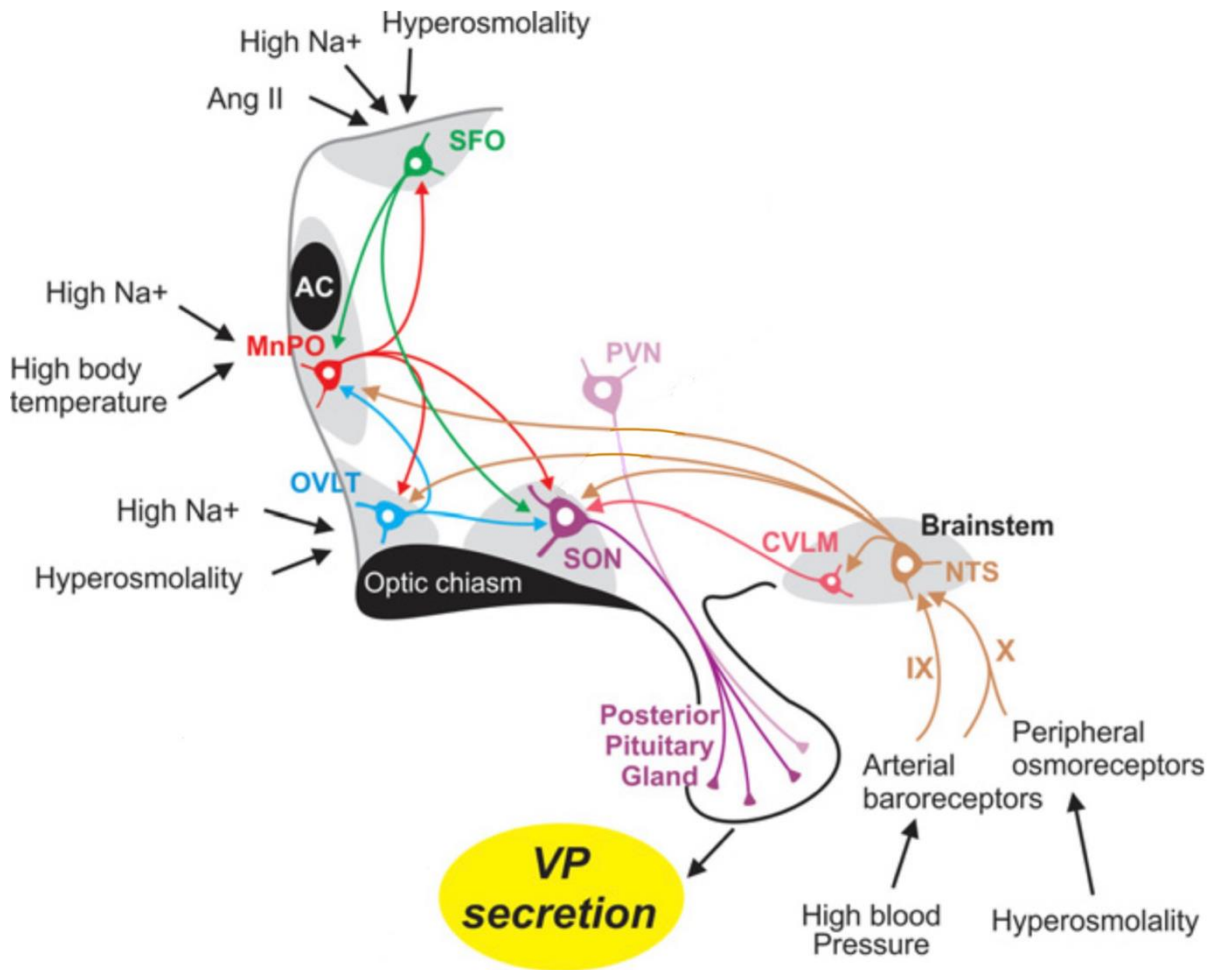


Figura 1. Complejo osmorreceptor central y control de la osmolaridad. Los osmorreceptores del cerebro y la periferia envían proyecciones al NSO para controlar su actividad de disparo. La actividad de disparo de las neuronas del NSO está directamente relacionada con la osmolaridad del plasma y determina la cantidad de VP secretada en la neurohipófisis (Choe & Bourque, 2015).

Tanto el SFO, el OVLT y el MnPO presentan neuronas osmosensibles, conocidas como osmorreceptores, que responden a estímulos osmóticos que excitan o inhiben la actividad de estas neuronas (Bourque et al., 1994; Grob et al., 2004). Bourque y colaboradores en 1995 haciendo registros en explantes que contenían al OVLT y al NSO (Figura 2A), reportaron que ante la presencia de un estímulo hiperosmótico con manitol sobre el OVLT las neuronas del NSO también aumentan su frecuencia de disparo, debido al aumento en los potenciales postsinápticos excitadores (EPSP) (Figura 2B, 2C), y que estos EPSP son sensibles a bloqueadores glutamatérgicos,

concluyendo que el OVLT envía proyecciones glutamatérgicas hacia las neuronas del NSO ante un estímulo hiperosmótico. Por otro lado, un estímulo hipoosmótico sobre el OVLT genera una disminución en la frecuencia de disparo de las neuronas del NSO asociada con una reducción en la frecuencia de los EPSP (Figura 2B, 2C) (Richard & Bourque, 1995).

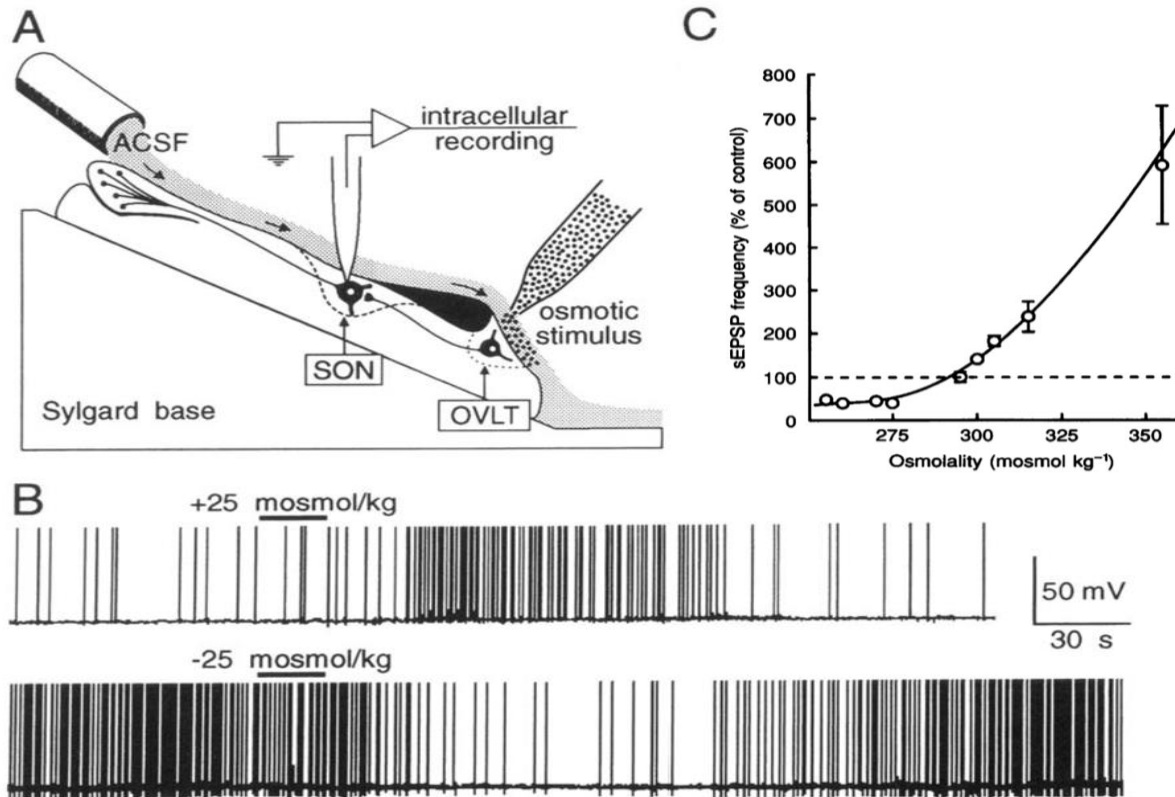


Figura 2. Efectos de la estimulación osmótica del OVLT sobre la actividad de las neuronas del NSO. A) Diagrama de un explante hipotalámico que contiene al OVLT y al NSO. B) Registros intracelulares del potencial de membrana de las neuronas del NSO. La aplicación de un estímulo hiperosmótico sobre el OVLT provoca un aumento reversible de la actividad de disparo de las neuronas del NSO, mientras que un estímulo hipoosmótico produce una disminución reversible de la actividad de disparo de las mismas. C) Promedio de los cambios en la frecuencia de los EPSP como resultado de la estimulación osmótica. (Adaptado de Richard & Bourque 1995; Bourque 1999).

Esta capacidad intrínseca del OVLT, del SFO y del MnPO para detectar cambios en la osmolaridad debidos a la concentración de Na⁺ extracelular ([Na⁺]_o) se debe a dos tipos de canales iónicos: a los canales que son activados en respuesta a los cambios

en el volumen celular (Bourque, 2008; Liedtke et al., 2000), y a la presencia de canales de Na^+ dependientes de la $[\text{Na}^+]_o$ (Na_x) (Noda & Sakuta, 2013; Watanabe et al., 2000).

1.3 Núcleo Supraóptico

Como ya se mencionó antes, el NSO es importante en el control de la osmolaridad. Este núcleo es un agregado neuronal que pertenece al hipotálamo tuberal. Está formado por células neurosecretoras magnocelulares encargadas de la síntesis de oxitocina (OT) y vasopresina (VP). Estas neuronas magnocelulares se caracterizan por tener un diámetro celular entre 16-24 μm (Lambert et al., 1994).

Tanto en humanos como en roedores el NSO posee una forma triangular. Se localiza lateral al quiasma óptico y a la altura del núcleo supraquiasmático (Møller et al., 2018).

El NSO junto con el NPV son las fuentes principales de OT y VP que se liberan en la neurohipófisis en el llamado sistema hipotálamo-neurohipófisis (H-N), en respuesta al parto y lactancia (OT), y en la homeostasis de fluidos (VP y OT) (Hussy et al., 2000; Squire et al., 2003).

Las neuronas magnocelulares del NSO envían un solo axón hacia la neurohipófisis. De cada axón surgen 2,000-10,000 terminales neurosecretoras que contienen una gran cantidad de gránulos de secreción. La llegada de un potencial de acción a estas terminales permite la liberación de la hormona (OT o VP), que pasa a la circulación general por difusión a través de capilares fenestrados, donde finalmente alcanzarán sus órganos blanco (Leng et al., 1999; Brown et al., 2013).

Este sistema H-N resulta ser homólogo de otros sistemas de vertebrados inferiores, así como de invertebrados (Figura 3). Por ejemplo, el sistema órgano X-glándula sinusal de los crustáceos, formado por neuronas neurosecretoras que envían sus axones a la glándula sinusal, donde, secretan hormonas que regulan la osmolaridad, la conducta sexual y el crecimiento (Figura 3A). Este sistema endocrino resulta ser muy parecido al sistema cuerpo cardíaco-cerebro de los insectos (Carlisle & Passano, 1953; Knowles & Carlisle, 1956), formado por los núcleos, *pars intercerebralis* y *pars lateral* (Figura 3B). Ambas estructuras contienen células neurosecretoras que proyectan sus axones a pequeñas glándulas conocidas como *corpora cardíaca* y

corpora allata. Este sistema resulta importante para el crecimiento, retención de agua y reproducción, como lo es el sistema H-N en mamíferos. (Veelaert et al., 1998; Velasco et al., 2007).

Por otro lado, en vertebrados inferiores como los peces, también se presenta un sistema homólogo al sistema H-N de mamíferos, formado por el núcleo preóptico que contiene células neuroendocrinas que proyectan hacia la neurohipófisis. El núcleo preóptico de vertebrados inferiores, se diferencia en el NSO y el NPV en vertebrados superiores como los mamíferos (Figura 3C, 3D) (Kandel, 1964; Hayward, 1973).

Todos estos sistemas son equivalentes fisiológica y anatómicamente, debido a que se encuentran formados por neuronas magnocelulares secretoras; sus axones forman tractos que llegan a lechos venosos o capilares donde las hormonas liberadas alcanzan la circulación general.

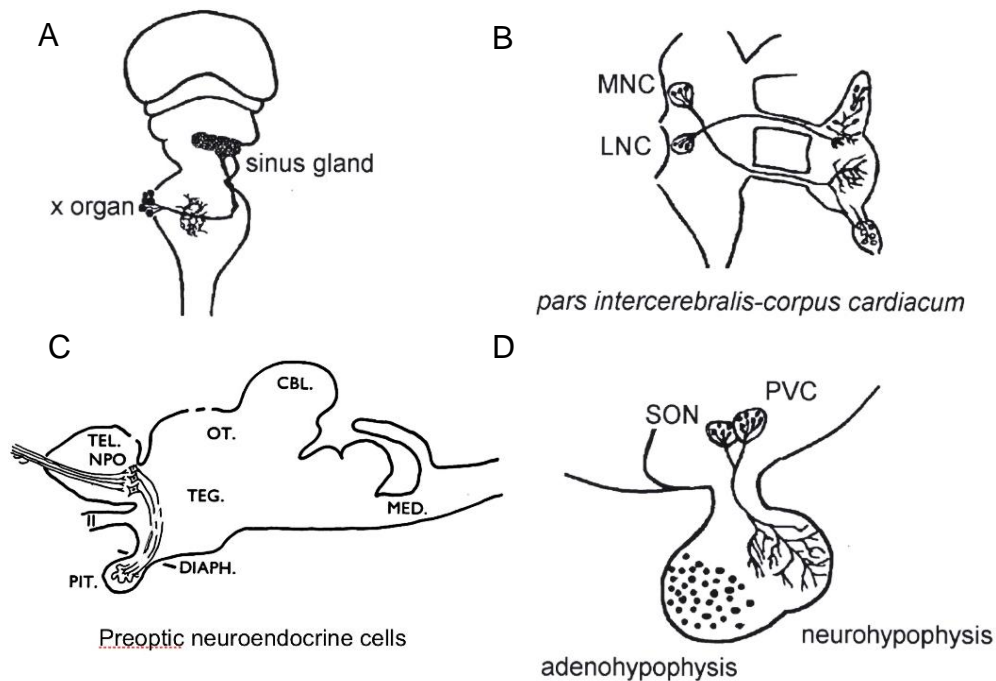


Figura 3. Sistemas neurosecretorios en diferentes organismos. A) Sistema órgano X-glándula sinusal de crustáceos. B) Sistema cuerpo cardíaco-cerebro de insectos. C y D) Eje H-N de peces y mamíferos, respectivamente (Adaptado de Kandel, 1964; Hayward, 1973).

1.4 Características electrofisiológicas de las neuronas magnocelulares del NSO

Se ha reportado que ambos tipos de neuronas muestran características similares:

- Presentan sinapsis de tipo somato-dendrítica, donde liberan su hormona correspondiente que actúa sobre auto-receptores. Generalmente este tipo de contacto se utiliza para el control de su frecuencia de disparo. (Andrew, 1981; Hirasawa et al., 2003).
- Las neuronas aisladas poseen una resistencia de entrada mayor a 500 MΩ y una constante de tiempo de 8.5 ms.
- Sus potenciales de acción se caracterizan por tener una amplitud de 80 mV y una duración de 1.5 ms.
- Generan hiperpolarizaciones pospotencial (AHP) y despolarizaciones pospotencial (DAP), ambas dependientes de Ca²⁺. (Oliet & Bourque, 1992; Armstrong et al., 1994; Armstrong et al., 2019).
- Ambos tipos de neuronas responden a VP (Hirasawa et al., 2003).

También se ha reportado que ambos tipos de neuronas magnocelulares del NSO presentan diferencias electrofisiológicas que las distinguen:

Neuronas oxitocinérgicas

La actividad de las neuronas oxitocinérgicas en condiciones basales es de baja frecuencia, la cual se incrementa por un estímulo hiperosmótico, el parto y la lactancia, generando trenes de potenciales de acción periódicos que son sincrónicos en todas las neuronas oxitocinérgicas, induciendo una liberación de OT pulsátil en la sangre (Hussy et al., 1997).

Estas neuronas también presentan una rectificación de salida sostenida (SOR por sus siglas en inglés) activada por un potencial de membrana despolarizado (Figura 4). La SOR se expresa en la mayoría de las neuronas oxitocinérgicas, lo cual puede ser utilizado para su identificación (Stern & Armstrong, 1995; Armstrong & Stern 1998; Hirasawa et al., 2003; Zampronio et al., 2010).

Otra característica que las distingue es la presencia de una corriente de K⁺ transitoria. Un estudio realizado por Widmer y colaboradores (1997) demuestra que las neuronas

oxitocinérgicas disociadas del NSO presentan este tipo de corriente también llamada corriente tipo IA, mientras que las que liberan VP carecen de ella (Widmer et al., 1997; Armstrong & Stern, 1998;). Esto no ocurre en registros en rebanadas, explantes o en neuronas disociadas que conservan sus proyecciones, debido a que los canales que median la corriente IA se encuentran en las dendritas de las neuronas vasopresinérgicas (Armstrong & Stern 1998; Armstrong et al., 2019).

Neuronas vasopresinérgicas

A diferencia de las oxitocinérgicas, las neuronas vasopresinérgicas presentan una actividad basal fásica tanto *in vivo* como *in vitro* (Armstrong & Stern 1998), la cual es reforzada por estímulos hiperosmóticos e hipovolémicos. Su actividad no es sincrónica, lo cual genera que la liberación de VP sea tónica (Hussy et al., 1997).

Como ya se mencionó, estas neuronas no presentan SOR (Figura 4) (Stern & Armstrong, 1995; Armstrong & Stern 1998; Hirasawa et al., 2003; Zampronio et al., 2010).

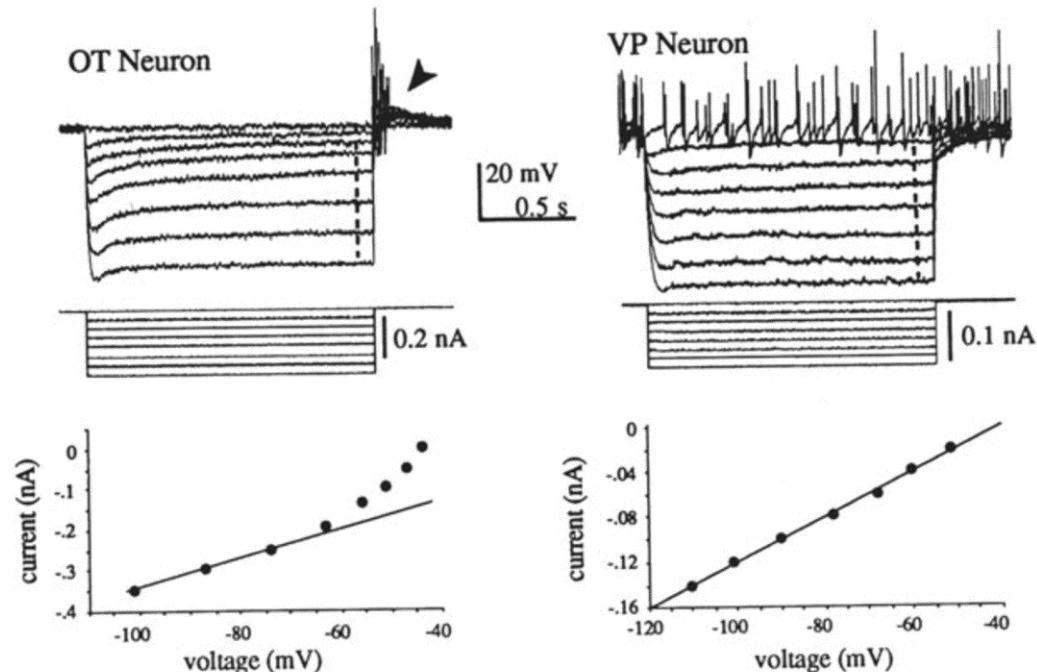


Figura 4. Diferenciación electrofisiológica entre las neuronas oxitocinérgicas y vasopresinérgicas. Registros intracelulares durante la inyección de corriente hiperpolarizante. Los trazos de la izquierda corresponden a una neurona oxitocinérgica cuya curva I/V muestra rectificación de salida. Los trazos de la derecha corresponden a una neurona vasopresinérgica cuya relación I/V es lineal (Armstrong & Stern 1998).

1.5 El NSO en el control de la osmolaridad

Se ha comprobado que no solamente las neuronas del OVLT ni del SFO responden a cambios en la osmolaridad. Varios estudios reportan que las neuronas del NSO y del NPV son también osmosensibles. El primero en demostrarlo fue Mason en 1980 mediante estímulos hiperosmóticos con manitol y NaCl sobre una rebanada que contenía el NSO. Reportó que los estímulos hiperosmóticos provocan un aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas magnocelulares del NSO. Otros estudios demuestran que estas neuronas, tanto en registros en rebanada como en cultivos, se excitan e inhiben por estímulos hiper e hiposmóticos, respectivamente (Oliet & Bourque, 1992; Richard & Bourque, 1994; Prager_Khoutorsky & Bourque, 2015).

Oliet y Bourque en 1992 reportaron que esta propiedad osmosensible únicamente se presenta en las neuronas magnocelulares del NSO y no en las neuronas parvocelulares de este núcleo (Figura 5A), en respuesta a un estímulo hiperosmótico con manitol (+30 mosmol/kg). Ellos comprobaron que esta capacidad de detectar el estímulo hiperosmótico se debe a cambios en la resistencia de entrada por la apertura de canales catiónicos que no están involucrados con el potencial de acción (Figura 5B) (Oliet & Bourque, 1992).

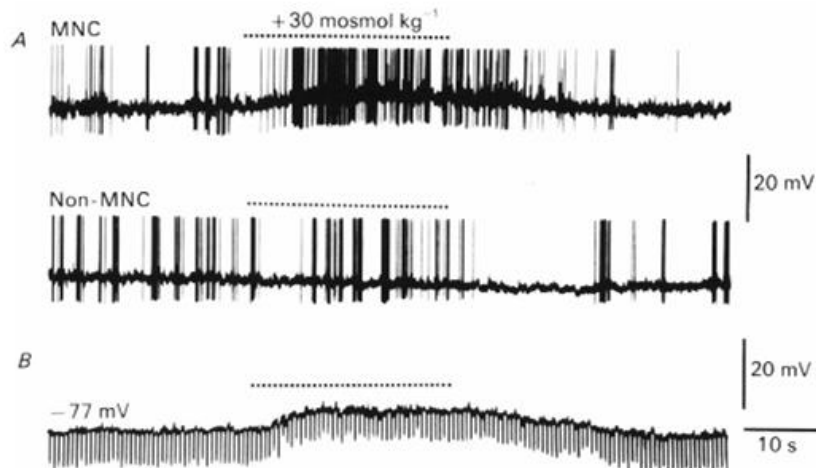


Figura 5. Osmosensibilidad de las neuronas magnocelulares del NSO. A) El registro superior muestra la respuesta de una neurona magnocelular al incremento de la osmolaridad. El trazo medio, pertenece una neurona parvocelular que no modifica ni su potencial de membrana ni la frecuencia de disparo ante el estímulo hiperosmótico. B) Registro de otra neurona que muestra los cambios en la resistencia de entrada durante el estímulo hiperosmótico. (Oliet & Bourque 1992).

Ahora se sabe que parte de esta osmosensibilidad de las neuronas del NSO se debe a la presencia de canales catiónicos inhibidos por estiramiento (Voisin et al., 1999). Gracias a los estudios de Liedtke y colaboradores en el 2000 se dió a conocer que estos canales catiónicos pertenecen a la familia de los TRPV (Transient Receptor Potential Cation Channel) (Liedtke et al., 2000). Estudios posteriores demuestran que tanto el TRPV1 como el TRPV4 son importantes para los osmorreceptores (Liedtke et al., 2000; Liedtke & Friedman, 2003). Fue hasta 2006 que se demostró que las neuronas del NSO necesitan de una variante en el N-terminal del TRPV1 para detectar los cambios en la osmolaridad. Esta variante permite que estos canales se activen ante la presencia de un estímulo hiperosmótico (Naeini et al., 2006). Brevemente, el mecanismo de activación de estos canales es el siguiente: Los TRPV1 interactúan con los microtúbulos debido a que presentan dos motivos de unión a la β -tubulina en su C-terminal (Goswami et al., 2004; 2007). Ante estímulos osmóticos las neuronas del NSO cambian su volumen celular (Figura 6A), lo cual activa a los TRPV1. Sin embargo, no está establecido si la activación de los TRPV1 se deba a la modulación

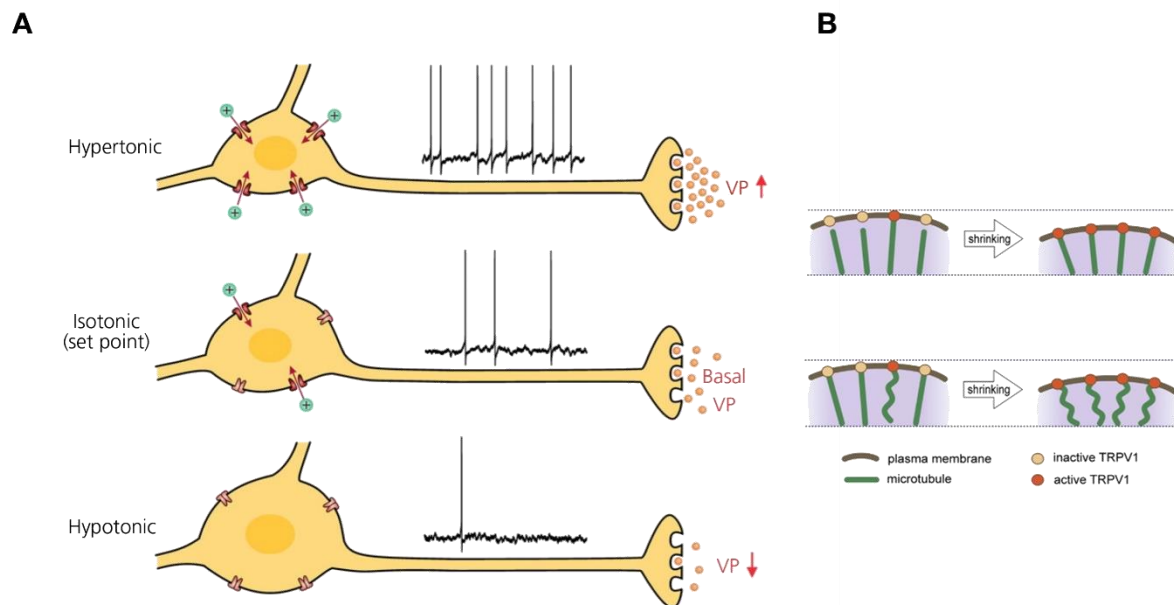


Figura 6. Las neuronas magnocelulares del NSO detectan los cambios en la osmolaridad debido a la presencia de los TRPV1. A) Los cambios osmóticos causan cambios proporcionales en el volumen celular. B) Posible mecanismo de activación de los TRPV1 por estímulos osmóticos (Prager-Khoutorsky et al, 2014; 2015).

de una fuerza entre la interacción microtúbulos-TRPV1, o tal vez a un cambio en la densidad de los sitios en los cuales los microtúbulos y el TRPV1 interactúan (Figura 6B) (Prager-Khoutorsky et al, 2014; Prager-Khoutorsky & Bourque, 2015).

Por otra parte Voisin y colaboradores en 1999 demostraron que las neuronas magnocelulares del NSO podrían operar como detectores de Na^+ . Ellos atribuyen la detección del Na^+ extracelular a un mecanismo que involucra a los canales TRPV, sin embargo el mecanismo no se ha esclarecido (Voisin et al., 1999; Naeini et al., 2006).

Néhme y colaboradores en el 2012 reportaron que las neuronas del complejo osmorreceptor central expresan el canal de Na^+ dependiente de Na^+ , Na_x . Mediante inmunofluorescencia demostraron que el canal Na_x se expresa en el NSO y en ambos tipos de neuronas: las oxitocinérgicas y las vasopresinérgicas (Figura 7). La expresión

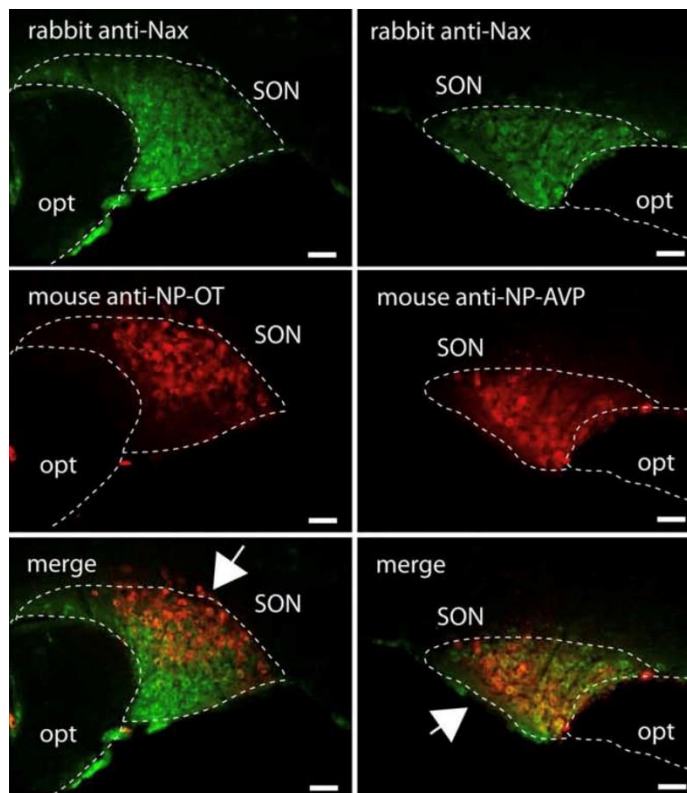


Figura 7. El canal Na_x se expresa en las neuronas magnocelulares del NSO de rata. Arriba se muestran la inmunofluorescencia del canal Na_x . En medio se identificaron a las neuronas con anti-oxitocina neurofisisina (izquierda) y anti-vasopresina neurofisisina (derecha). Abajo se muestra la superposición de ambas señales (Néhme et al., 2012).

de este canal en las neuronas magnocelulares del NSO sugiere que podría tener un papel funcional detectando los cambios osmóticos dados por Na⁺, y que no solamente se deba a los canales de tipo TRPV1.

1.6 Canal Na_x

El canal Na_x es un miembro de la familia de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, sin embargo, muestra marcadas diferencias en las regiones clave para la detección del voltaje y la inactivación, así como una homología del 40% a nivel proteína con respecto a los otros canales de la familia (Goldin et al., 2000). En el segmento S4, que es crítico para detectar el voltaje, la secuencia de aminoácidos es diferente en el canal Na_x debido a que posee menos aminoácidos con carga positiva comparada con otros miembros de la familia (Figura 8). De la misma manera su asa intracelular III es poco conservada, por lo que estos canales son insensibles a la tetrodotoxina (Akopian et al., 1997; Ogata & Ohishi, 2001; Matsumoto et al., 2015).



Figura 8. Secuencia de aminoácidos del segmento S4 del canal Na_x. El canal Na_x presenta menos aminoácidos cargados positivamente en su segmento S4 comparado con otros canales de la familia dependientes de voltaje (Nav1.2 y Nav1.5) y con el canal de Na⁺ de la anguila eléctrica (Ogata & Ohishi, 2002).

Watanabe y colaboradores reportaron que este canal es predominantemente expresado en las células gliales de los órganos circunventriculares incluyendo el SFO y el OVLT (Watanabe et al., 2000), los cuales como ya se mencionó forman parte del complejo osmorreceptor central. Este mismo grupo generó ratones “knock-out” para el canal Na_x. Reportaron que en condición de deshidratación, los ratones knock-out no paran de ingerir sal, a diferencia de los ratones silvestres, concluyendo que el canal Na_x también es importante en la ingesta de Na⁺ (Watanabe et al., 2000). Estudios posteriores demostraron que el canal expresado en las células gliales interactúa con la Na⁺/K⁺ATPasa para asistir su activación (Shimizu et al., 2007), y que péptidos

relacionados con la homeostasis de Na^+ , como la endotelina-3, pueden mejorar la sensibilidad del Na_x y suprimir su ingesta (Himaya et al., 2013).

Hasta el momento se ha reportado que la función principal del canal Na_x es detectar las altas concentraciones de Na^+ extracelular, mostrando un umbral en valores aproximados o mayores a 150 mM de Na^+ extracelular *in vitro*, permitiendo su apertura y la entrada de este ion (Noda & Himaya, 2005). Sin embargo, se sabe que la $[\text{Na}^+]_o$ es estrictamente controlada en valores de 135-145 mM en mamíferos, sugiriendo que los sensores de la concentración de Na^+ pueden detectar el incremento del ion en estos rangos para poder mantener los niveles fisiológicos (Noda, 2007; Hiyama et al., 2013).

A diferencia de los trabajos hechos en ratones que demuestran la expresión del canal Na_x en las células gliales, los estudios realizados en ratas muestran que este canal es expresado también en neuronas. Por ejemplo, como ya se mencionó arriba, las neuronas del complejo osmorreceptor central expresan el canal Na_x (Néhme et al., 2012). Además, se ha sugerido que el canal Na_x expresado en las neuronas del MnPO funciona como un canal de fuga para la detección del Na^+ extracelular (Tremblay et al., 2011).

2 ANTECEDENTES

Se sabe que la mayoría de las neuronas del complejo osmorreceptor central (OVL, SFO, MnPO, NPV y NSO) detectan cambios en la osmolaridad y expresan canales de Na^+ del tipo Na_x . En nuestro laboratorio se ha observado que las células del órgano X del acocil *Procambarus clarkii*, presentan una corriente catiónica de entrada al ser estimuladas con altas concentraciones de Na^+ cuando se mantiene la osmolaridad en valores fisiológicos. Además, dicha corriente es insensible a tetrodotoxina y a cadmio, y podría deberse a la expresión de canales de Na^+ dependientes de la $[\text{Na}^+]_o$ (tipo Na_x), como los reportados en ovocitos de *Xenopus* (Vasilyev et al., 2002).

3 JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado inmunorreactividad a canales Na_x en las neuronas magnocelulares del sistema H-N, sin embargo, hasta el momento no se cuenta con evidencias electrofisiológicas que indiquen que dichos canales modulan la excitabilidad neuronal en respuesta a cambios en la $[\text{Na}^+]_o$.

4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Los canales Na_x son transductores y efectores, capaces de detectar los cambios en la $[\text{Na}^+]_o$ y modular la excitabilidad neuronal regulando el flujo de Na^+ a través de la membrana plasmática?

5 HIPÓTESIS

La corriente generada por los canales Na_x es una corriente de fuga cuya magnitud depende de la $[\text{Na}^+]_o$, como se trata de canales abiertos a todos los valores de potencial, el cambio en concentración de cationes en el medio intracelular mueve el potencial de membrana acercándolo o alejándolo del umbral de disparo neuronal.

6 OBJETIVOS

GENERAL

- Determinar la respuesta de las neuronas magnocelulares a los estímulos altos en Na^+ extracelular.

ESPECÍFICOS

- Establecer un cultivo primario de neuronas magnocelulares del NSO para su registro electrofisiológico.
- Evaluar los cambios en la excitabilidad de las neuronas magnocelulares del NSO debidos a altas $[\text{Na}^+]_o$, y comparar con aquellas provocadas por cambios hiperosmóticos no debidos a Na^+ .
- Determinar el umbral, la respuesta máxima y la concentración media ($C_{1/2}$) de Na^+ extracelular para la activación de la corriente Na_x .

7 MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras Wistar de 5 semanas, las cuales se sacrificaron por decapitación. El encéfalo se obtuvo en la solución de Hanks a 4° C con la siguiente composición (mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 0.44 KH_2PO_4 , 0.33 Na_2PO_4 , 5.54 glucosa y 20 HEPES, ajustada a un pH de 7.4. Después el encéfalo se colocó en una matriz para obtener rebanadas de 1000 μm , donde se ubica el NSO (7.2 - 8.2 a la línea interaural) (Paxinos & Watson, 1997).

7.1 Disociación de las neuronas del NSO

Una vez obtenido el NSO, éste se incubó en papaína 20 U/mL por 30 min a 37°C en solución de Earl con la siguiente composición (en mM): 117 NaCl, 5.3 KCl, 1.8 CaCl_2 , 0.8 MgSO_4 , 26 NaHCO_3 , 1.17 NaH_2PO_4 y 10 HEPES, ajustada a un pH de 7.4. Seguido de esto, las neuronas del NSO se disociaron mecánicamente con pipetas siliconizadas, después se centrifugaron a 1000 rpm durante 2 min. El sobrenadante se desechó y el botón se homogenizó con 500 μL de medio Neurobasal complementado con el suero B37, L-Glutamina y antibiótico/antimicótico. Finalmente las células se sembraron en cámaras de registro.

7.2 Electrofisiología

Después de 24 horas de cultivo se hizo el registro electrofisiológico de las neuronas. Para el registro de célula completa se utilizaron pipetas con una resistencia de 4-8 M Ω . Se realizaron registros en la configuración de célula completa en fijación de voltaje y fijación de corriente usando el amplificador Axopatch 200A. Todos los registros fueron filtrados a 5 Hz (“Lowpass Bessel Filter”). Los protocolos utilizados fueron los siguientes:

7.2.1 Identificación de las neuronas del NSO

Mediante la técnica de fijación de voltaje se llevó a las neuronas a un potencial de mantenimiento (Vh) de -60 mV y se dieron 12 pulsos cuadrados de voltaje en pasos de 10 mV con una duración de 100 ms.

Después mediante fijación de corriente se utilizó un protocolo que consistió en 8 pulsos cuadrados de corriente de -100 a 40 pA en pasos de 20 pA con una duración de 1 s y se obtuvieron las curvas I/V de las células para su identificación.

7.2.2 Estímulos hiperosmóticos

La solución externa para este protocolo fue fluido cerebroespinal artificial (ACSF por sus siglas en inglés) con la siguiente composición (mM): 110 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 Glucosa y 26 NaHCO₃, mientras que la composición de la solución interna utilizada fue la siguiente (mM): 130 Gluconato de K⁺, 5 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES y 0.02 EGTA. A ambas soluciones se les ajustó el pH a 7.4 y con una osmolaridad del 300 mOsm.

Después, tanto en fijación de voltaje como en fijación de corriente, se utilizó el siguiente protocolo:

- 20 s de perfusión con ACSF → 60 s de ACSF alta en Na⁺ (+25 mM NaCl) → 40 s de recuperación.
- 20 s de perfusión con ACSF → 60 s de ACSF alta en NMGI_n-Cl (+25 mM NMGI_n-Cl) → 40 s de recuperación.

7.2.3 Curva de activación

Se realizaron registros en fijación de corriente utilizando 3 tipos de estímulos hiperosmóticos establecidos con NaCl (+ 10, 20, y 30 mM), con el protocolo descrito arriba: 20 s de perfusión con ACSF → 60 s de ACSF + 10, 20, 30 mM NaCl → 40 s de recuperación.

7.2.4 Estímulo hipernatrémico isoosmótico

La solución externa para este protocolo tenía la siguiente composición (mM): 136 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES. La composición de la solución interna utilizada fue la siguiente (mM): 130 KCl, 10 NaCl, 2 MgCl₂, 0.02 EGTA y 10 HEPES. Además se utilizó una solución hipernatrémica isoosmótica con la siguiente composición (mM): 68 Citrato de Na⁺, 34 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES. Todas las soluciones se ajustaron a un pH de 7.4 y una osmolaridad de 300 mOsm.

Las células se registraron en fijación de voltaje y de corriente. El estímulo hipernatrémico isoosmótico tuvo una duración de 20 s.

7.3 Análisis estadístico

Todos los resultados son expresados como el promedio ± SEM. Las comparaciones de los promedios entre los grupos fueron hechas utilizando una prueba de *t* Student pareada o análisis de varianza de una vía. En este caso las diferencias en los promedios fueron considerados significantes cuando $p < 0.05$. Además se utilizó la prueba de Tukey para comparar los promedios entre los grupos.

8 RESULTADOS

8.1 Obtención de las neuronas magnocelulares del NSO

Mediante el método de disociación utilizado, se obtuvieron neuronas del NSO que tenían un diámetro entre 18-24 μm , y no presentaron proyecciones (Figura 9). Para el registro electrofisiológico solamente se utilizaron las neuronas con estos diámetros.

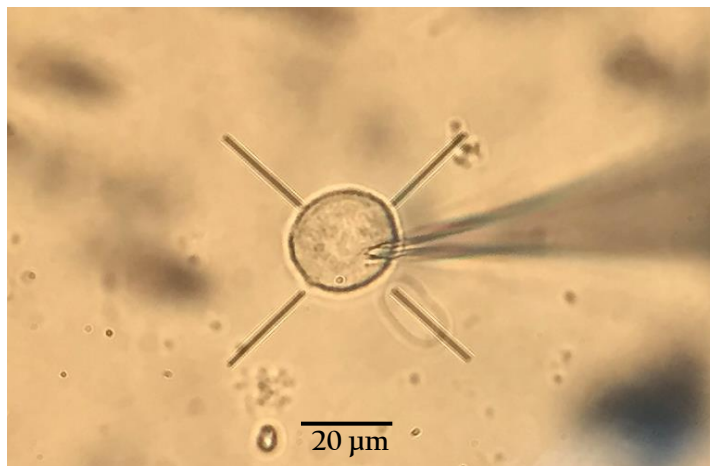


Figura 9. Neurona magnocelular del NSO. Obtenida mediante el método de disociación descrito arriba.

8.2 Identificación de las neuronas del NSO

Se realizaron registros de estas neuronas en la configuración de célula completa, en fijación de corriente y voltaje. Algunas neuronas presentaron actividad espontánea como ya se había reportado (Armstrong et al., 1994), con potenciales de acción que tienen una amplitud de aproximadamente 80 mV pico a pico. Además presentan AHP de 8-9 mV. Estas neuronas con disparo espontáneo responden aumentando su frecuencia de disparo ante la inyección de una corriente despolarizante (Figura 10A). Además al obtener los trazos de corrientes, por el protocolo descrito antes, se observó que estas neuronas presentan una corriente transitoria de Na^+ y una corriente sostenida de K^+ (Figura 10B).

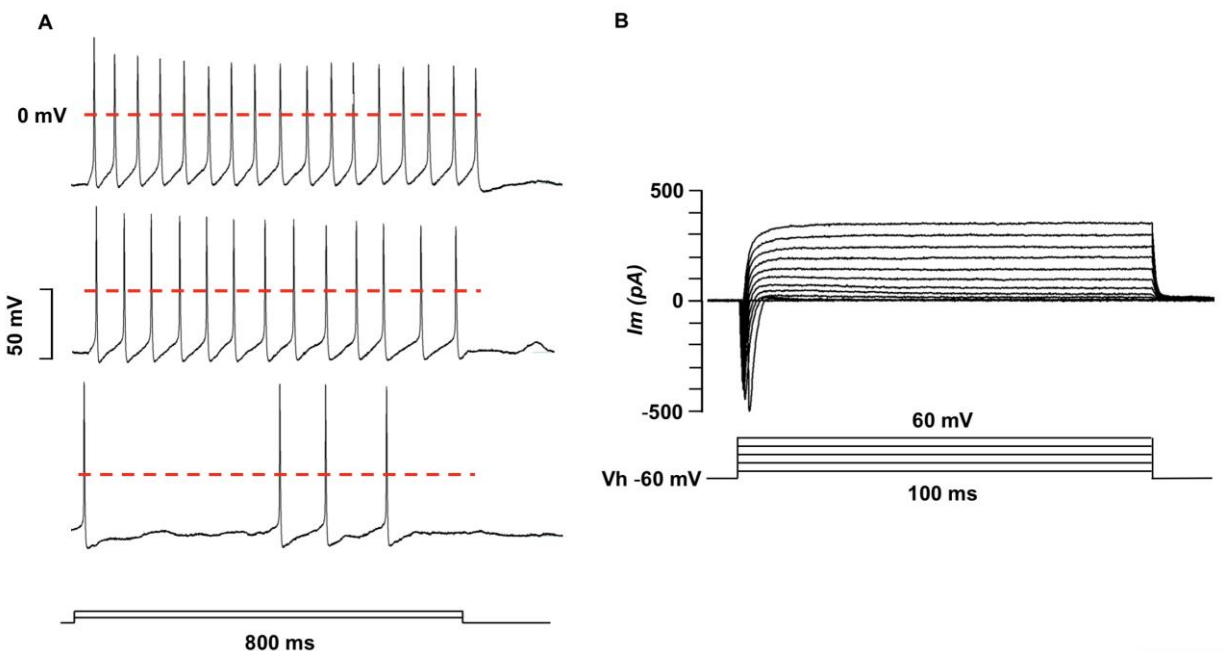


Figura 10. Registro en fijación de corriente y voltaje de una neurona del NSO con actividad espontánea. A) Registro en fijación de corriente. La inyección de corriente despolarizante provoca un aumento en la frecuencia de disparo. La línea punteada representa el $V_m = 0$ mV. B) Obtención de los trazos de corriente de la misma neurona mediante fijación de voltaje.

También se registraron otras neuronas que no presentan disparo espontáneo pero disparan un potencial de acción cuando se les inyecta corriente despolarizante (Figura 11A). Al obtener los trazos de corrientes (Figura 11B) se observó que estas neuronas presentan una corriente transitoria de Na^+ , una corriente sostenida de K^+ y una corriente transitoria de K^+ (IA) señalada con el área sombreada.

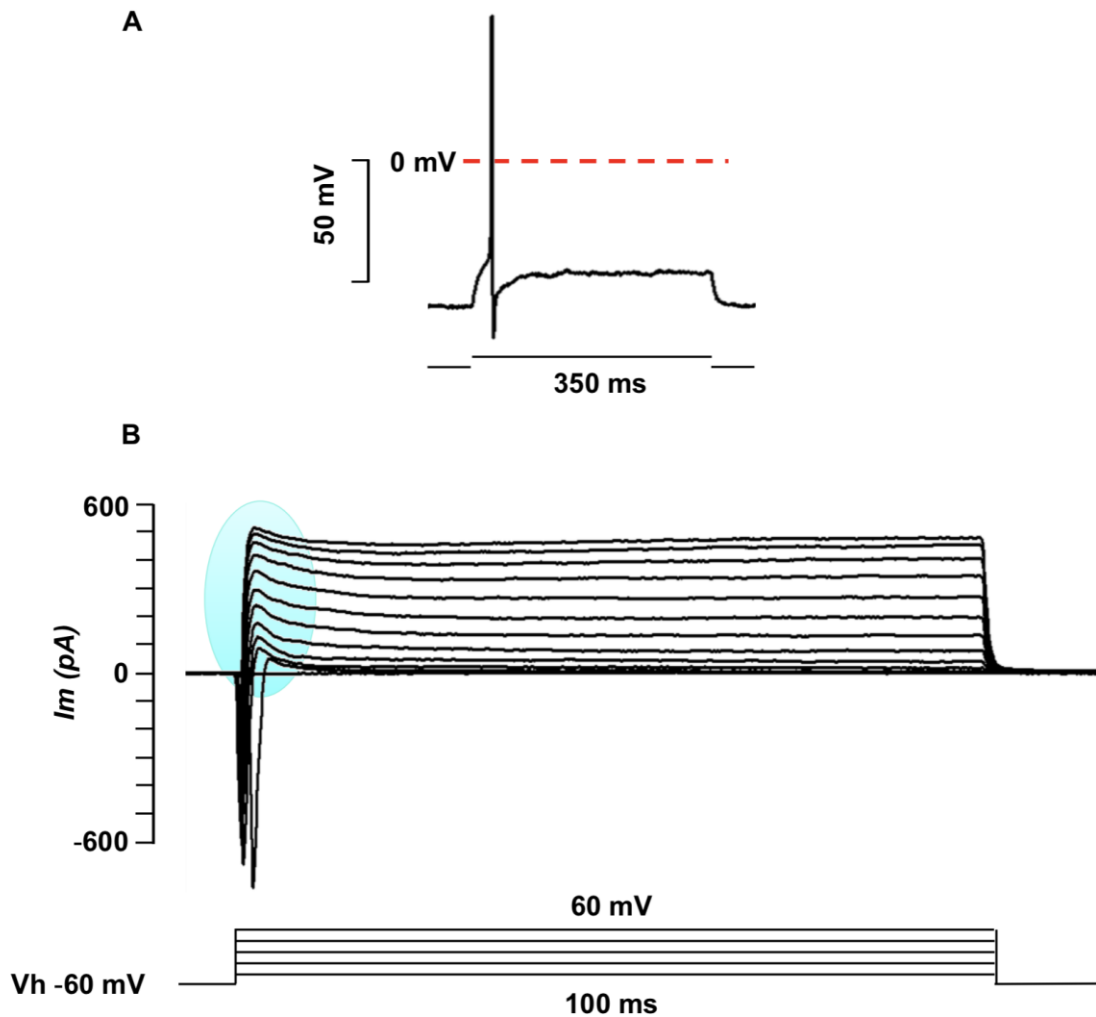


Figura 11. Registro en fijación de corriente y voltaje de una neurona del NSO silente. A) La inyección de corriente despolarizante provocó el disparo de solamente un potencial de acción. B) Trazos de corriente de la misma neurona. El área sombreada señala la corriente tipo IA.

Finalmente se utilizó el criterio de identificación establecido por Armstrong en 1995, en el cual se observó que la inyección de corriente hiperpolarizante genera dos tipos de respuesta, neuronas que presentan una relación I/V lineal (Figura 12A) identificadas como neuronas vasopresinérgicas, y neuronas que presentan una SOR, identificadas como oxitocinérgicas (Figura 12B). La SOR se nota en los valores del potencial de membrana más despolarizados.

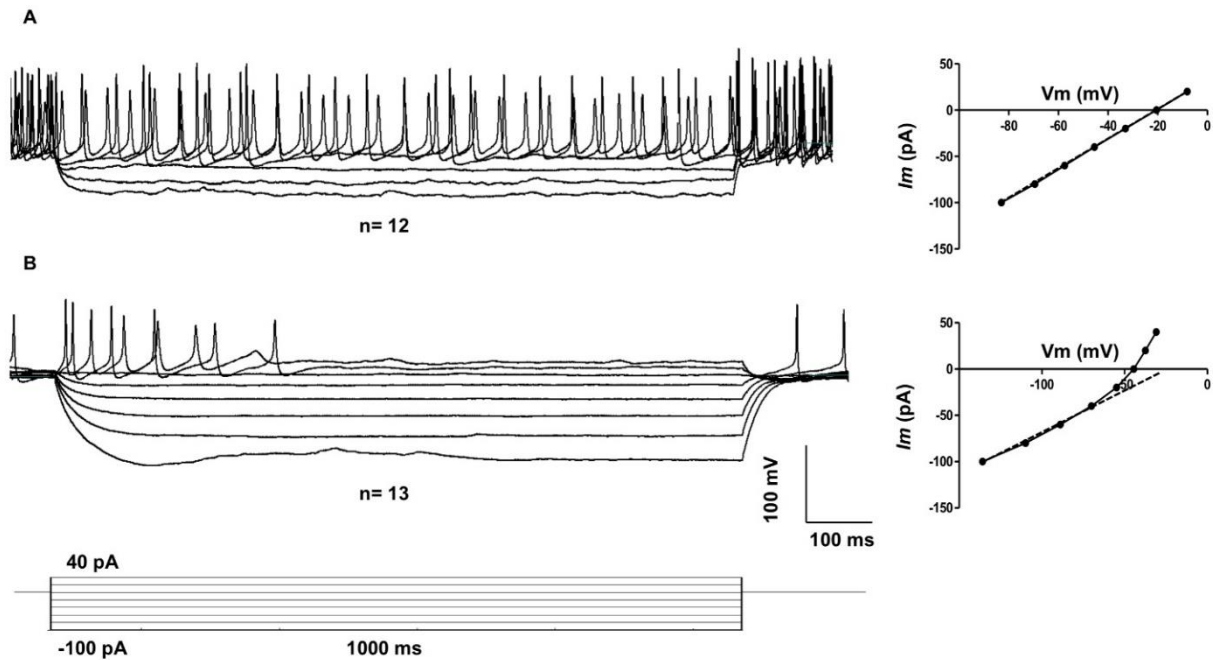


Figura 12. Identificación de las neuronas magnocelulares mediante el criterio establecido por Armstrong (1994). A) Registro en fijación de corriente de una neurona identificada como vasopresinérgica debido a que presenta una relación I/V lineal. B) Neurona identificada como oxitocinérgica debido a la presencia de la SOR. En la curva I/V se nota la SOR a valores más despolarizados.

8.3 Estímulos hiperosmóticos

Posterior a la identificación de las neuronas del NSO, se registraron neuronas en fijación de corriente para ver el cambio en el potencial de membrana debido a los estímulos hiperosmóticos que fueron de dos tipos: un estímulo hiperosmótico alto en Na^+ (+ 25 mM NaCl) y un estímulo hiperosmótico generado con NMGI n-Cl (+25 mM NMGI n-Cl), el cual se disocia en un catión monovalente no permeable y el ion Cl^- . Ambas soluciones tenían una osmolaridad de 350 mOsm, mientras que la solución control tenía una concentración de $\text{Na}^+ = 136 \text{ mM}$ (300 mOsm). La mayoría de las neuronas registradas presentaron un potencial de membrana cercano a -50 mV.

Como se muestra en la Figura 13, los estímulos hiperosmóticos producen una despolarización de la membrana en las neuronas silentes. Sin embargo, el estímulo hiperosmótico alto en Na^+ (160 mM Na^+ 350 mOsm) provocó una mayor despolarización (Figura 13A) comparado con el estímulo hiperosmótico con NMGI n-Cl (136 mM Na^+ 350 mOsm) (Figura 13B).

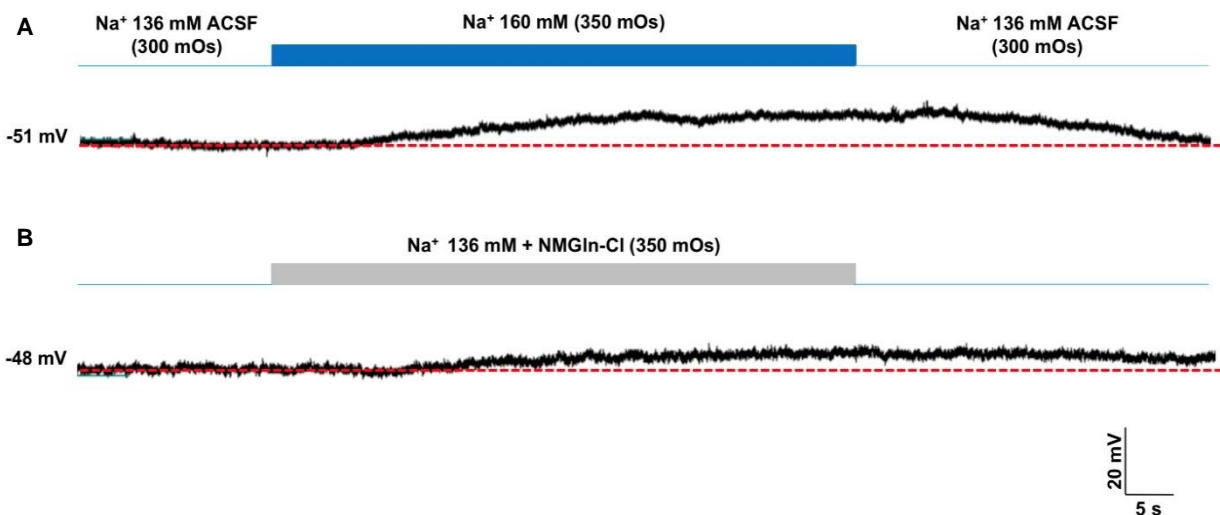


Figura 13. Los estímulos hiperosmóticos provocan una despolarización de la membrana en una neurona silente ($n=21$). A) El estímulo hiperosmótico alto en Na^+ (barra azul) produce una despolarización. B) En la misma célula, el estímulo hiperosmótico con NMGI n-Cl (barra gris) produce una despolarización. Note que la despolarización es mayor con el estímulo alto en Na^+ . La línea punteada representa el potencial de reposo.

Esto mismo se observó en las neuronas que presentaron disparo espontáneo, es decir, el estímulo hiperosmótico alto en Na^+ produce una mayor despolarización de la membrana, además de aumentar su frecuencia de disparo de potenciales de acción (Figura 14A). El estímulo hiperosmótico con NMGI n-Cl en este tipo de neuronas también produce una despolarización, de menor magnitud, y no se observa un cambio evidente en su frecuencia de disparo (Figura 14B).

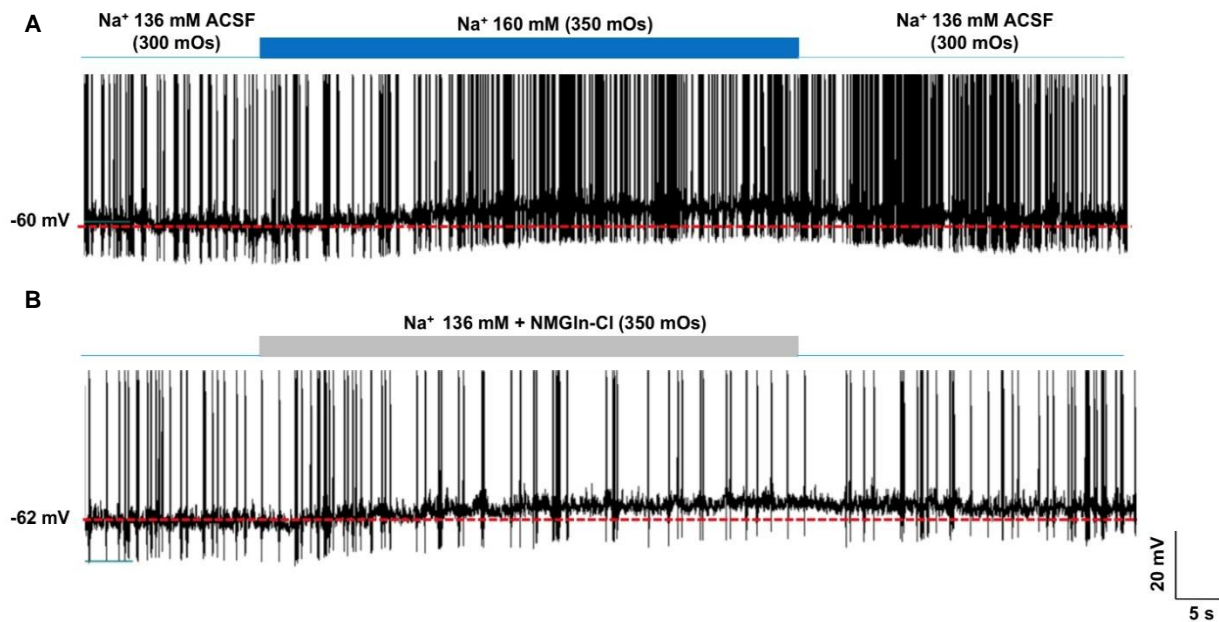


Figura 14. Los estímulos hiperosmóticos provocan despolarización de la membrana en una neurona con disparo espontáneo ($n=6$). A) El estímulo hiperosmótico alto en Na^+ produce una despolarización y un aumento en la frecuencia de disparo. B) En la misma célula, el estímulo hiperosmótico con NMGI n-Cl produce despolarización sin un cambio evidente en la frecuencia de disparo. Nótese aquí también que la despolarización es mayor con el estímulo hiperosmótico alto en Na^+ .

Al hacer el análisis estadístico observamos que ambos estímulos hiperosmóticos provocan una despolarización de la membrana (Figura 15A, 15B). Sin embargo, se puede apreciar que el cambio en el voltaje es mayor con el estímulo hiperosmótico alto en Na⁺. Además, la prueba de *t* Student pareada arrojó que este cambio es significativo (Figura 15C) (n = 18 p < 0.01).

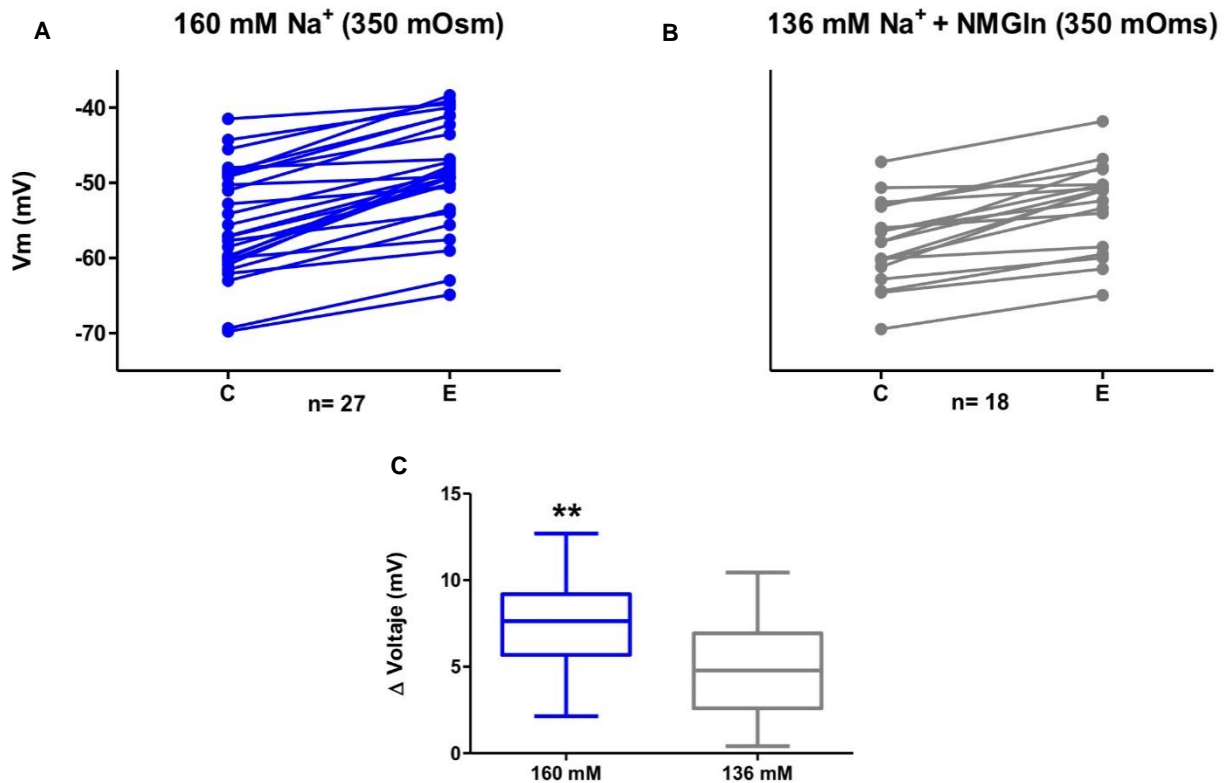


Figura 15. El estímulo hiperosmótico alto en Na⁺ provoca una despolarización de mayor magnitud. A) Despolarización debida al estímulo hiperosmótico alto en Na⁺. B) Despolarización provocada por el estímulo hiperosmótico con NMGI n-Cl (en la gráfica C representa el Vm en solución control y E el Vm cuando se aplica el estímulo hiperosmótico. C) Cambio en el voltaje provocado por medio hiperosmótico con 160 o 136 mM de Na⁺. El cambio es mayor y es significativo con el estímulo hiperosmótico alto en Na⁺. El análisis se realizó mediante una prueba de *t* Student pareada con una n = 18, p < 0.01. Nota: A las 18 células se les aplicó ambos estímulos.

Posteriormente, se hicieron registros en fijación de voltaje, llevando las neuronas del NSO a un $V_h = -50$ mV, para ver el cambio en la corriente. En la Figura 16 podemos observar, como ya se había visto en otras neuronas, que el estímulo hiperosmótico alto en Na^+ produce una despolarización de la membrana, y que esta despolarización coincide con una corriente de entrada (Figura 16A). Al realizar el análisis estadístico podemos observar que el promedio de la corriente de entrada es de -14.72 pA con una $n = 10$. No hay un cambio significativo comparado con la corriente de entrada que provoca el estímulo hiperosmótico con NMGln-Cl (Figura 16B).

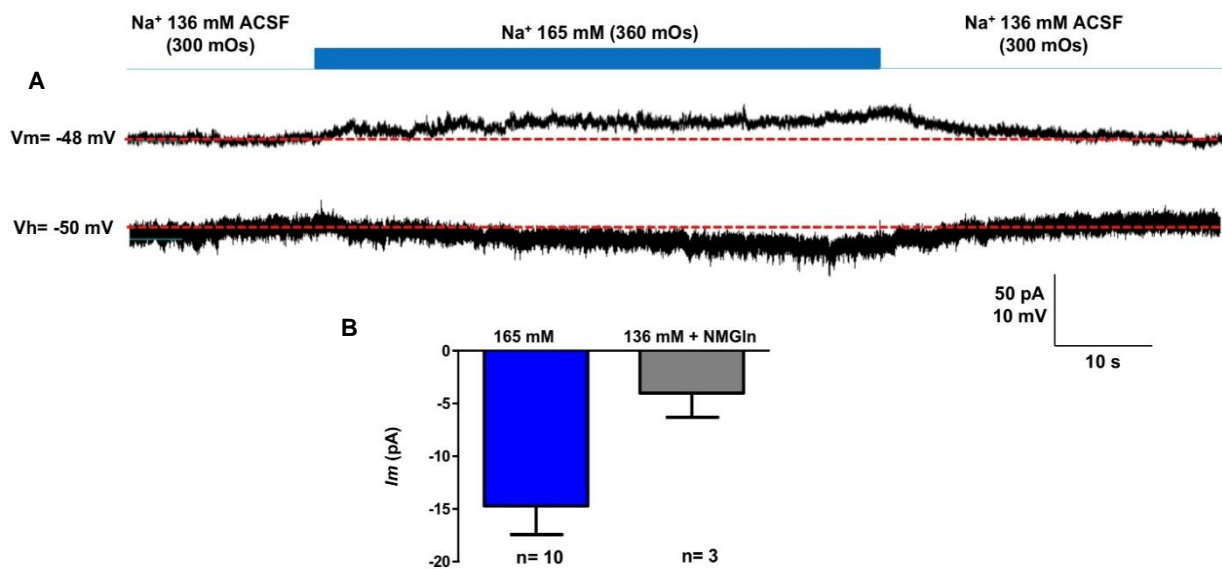


Figura 16. El estímulo hiperosmótico alto en Na^+ produce una corriente de entrada. A) La despolarización debida al estímulo hiperosmótico alto en Na^+ (trazo de arriba) correlaciona con una corriente entrante (trazo de abajo). B) Al realizar una prueba de t para comparar promedios no se muestra una diferencia significativa entre la corriente de entrada producida por el estímulo hiperosmótico alto en Na^+ ($n = 10$) y la debida estímulo hiperosmótico con NMGln-Cl ($n = 3$), aunque el promedio de la corriente debido al primer estímulo es mayor. Los promedios de la corriente fueron de -14.72 ± 2.71 y -4.03 ± 2.28 , para el estímulo hiperosmótico alto en Na^+ y debido a NMGln, respectivamente.

8.4 Curva de activación

Después se realizó otra serie de experimentos para observar la dependencia a Na^+ extracelular de la respuesta al estímulo hiperosmótico. Se aplicaron 3 estímulos hiperosmóticos que tenían 10, 20 y 30 mM adicionales de NaCl con una osmolaridad de 320, 340 y 360 mOsm, respectivamente. Estos estímulos se aplicaron a 6 neuronas del NSO y se observó que todos provocan una despolarización de la membrana (Figura 17A-C).

Se realizó un análisis de varianza de una vía con una prueba de Tukey para comparar los promedios de los estímulos (Figura 17D). Se observó que el estímulo hiperosmótico con 10 mM de NaCl (145 mM Na^+) es suficiente para provocar la despolarización de la membrana, y que este cambio es significativo (con un promedio de 3.92 mV) comparado con la solución control (136 mM Na^+) que no genera una despolarización de la membrana, y comparado con los otros dos estímulos

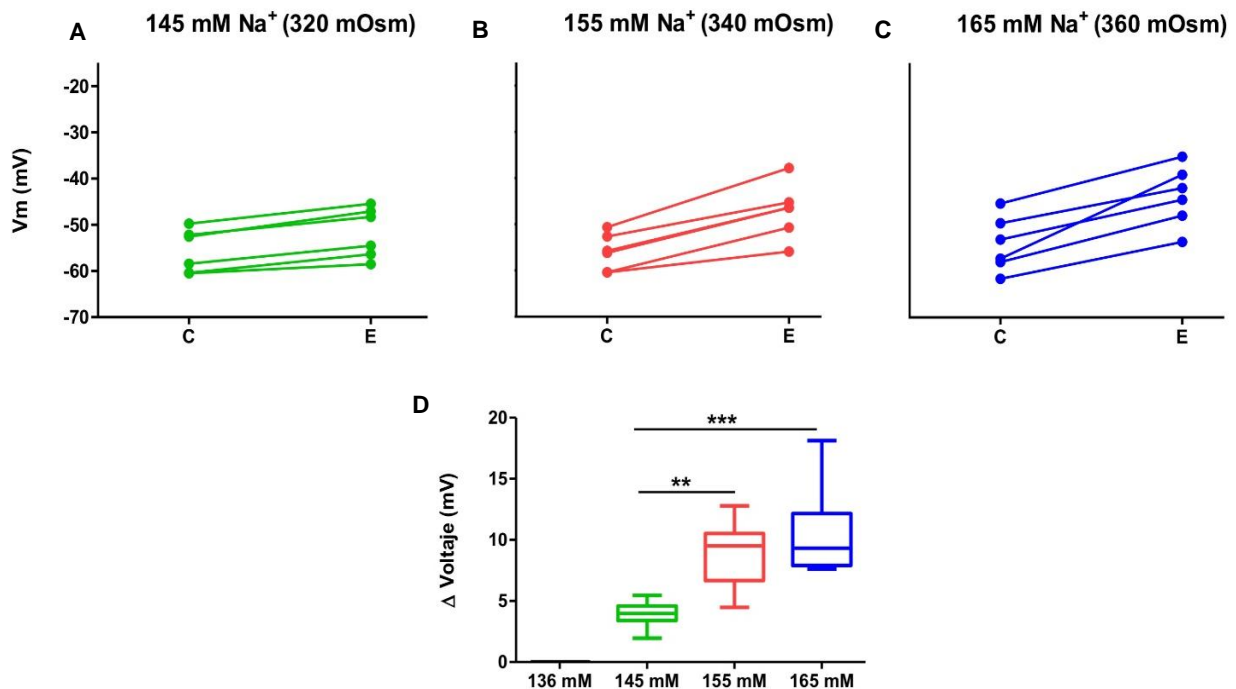


Figura 17. La magnitud de la despolarización depende del Na^+ extracelular. A, B, C) La despolarización provocada por 3 estímulos hiperosmóticos +10, 20 y 30 mM de NaCl. D) El cambio en el voltaje por los 3 estímulos. Note que también se graficó que la solución control que contenía 136 mM de Na^+ no provocó un cambio en el voltaje. Se realizó una ANOVA de una vía y una prueba de Tukey con una $n=6$ y $p < 0.0001$.

hiperosmóticos. Además, se observó que entre el estímulo con 20 mM adicionales de NaCl (155 mM Na⁺) y con 30 mM adicionales de NaCl (165 mM Na⁺), el cambio en el voltaje no fue significativo (los promedios fueron 8.91 y 10.4 mV, respectivamente).

8.5 Estímulo hipernatrémico isoosmótico

Finalmente se aplicaron estímulos altos en Na⁺ (hipernatrémico) pero con la misma osmolaridad que la solución control (300 mOsm). Esto se logró con la solución descrita en métodos. Se observó que este estímulo alto en Na⁺ e isoosmótico sobre las neuronas del NSO provoca una despolarización reversible de la membrana (Figura 18 trazo superior), y que además correlaciona con una corriente entrante (Figura 18 trazo inferior).

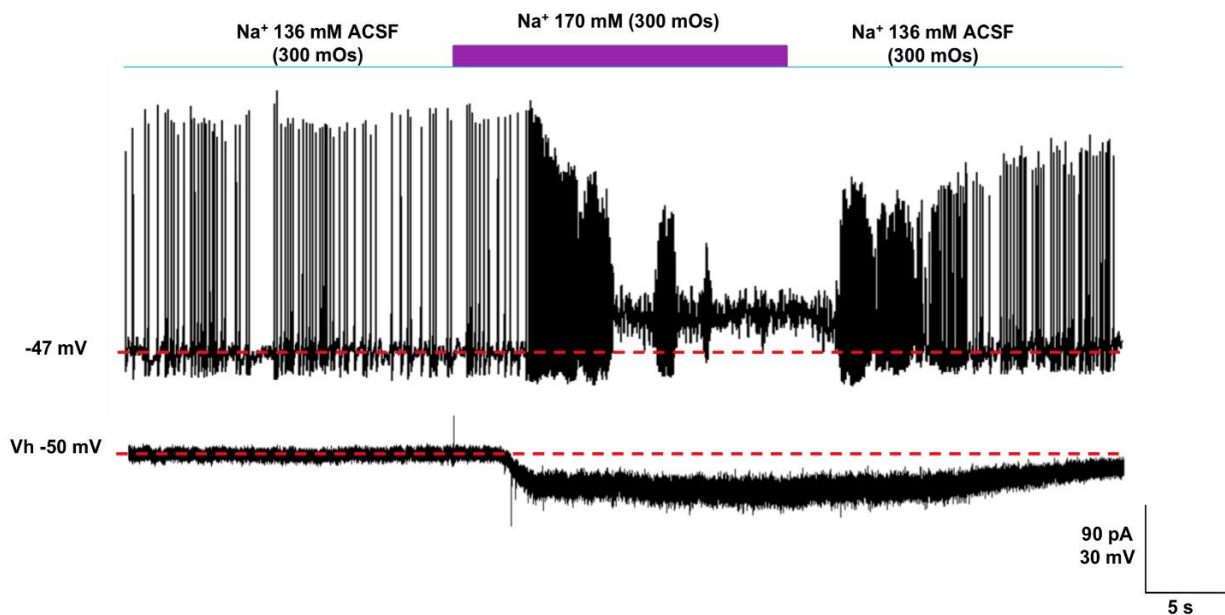


Figura 18. Trazo representativo de la respuesta de una neurona del NSO ante un estímulo hipernatrémico isoosmótico. En fijación de corriente (trazo de arriba) se observa que la célula responde con una despolarización de la membrana. En fijación de voltaje (trazo de abajo) se observa una corriente de entrada que correlaciona temporalmente con la despolarización.

Al realizar el análisis estadístico, se observó que el estímulo alto en Na⁺ isoosmótico provoca una despolarización de la membrana, además este cambio es significativo al realizar una prueba de *t* Student pareada ($n=4$, $p < 0.01$) (Figura 19A). Esta respuesta se comparó con las provocadas por los estímulos hiperosmóticos y se observó que tanto la corriente de entrada como el cambio en el voltaje son mayores cuando se aplica el estímulo alto en Na⁺ isoosmótico. Al realizar el análisis de varianza ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para comparar los promedios. Se observó un cambio significativo en la corriente de entrada entre el estímulo hiperosmótico con NMGIIn y el estímulo hipernatrémico isoosmótico. Los promedios de la corriente fueron -4 y -27.65 pA, respectivamente ($p < 0.0001$) (Figura 19B). También se observó que el cambio en el voltaje ante el estímulo alto en Na⁺ isoosmótico fue mayor y significativo comparado con ambos estímulos hiperosmóticos (Figura 19C).

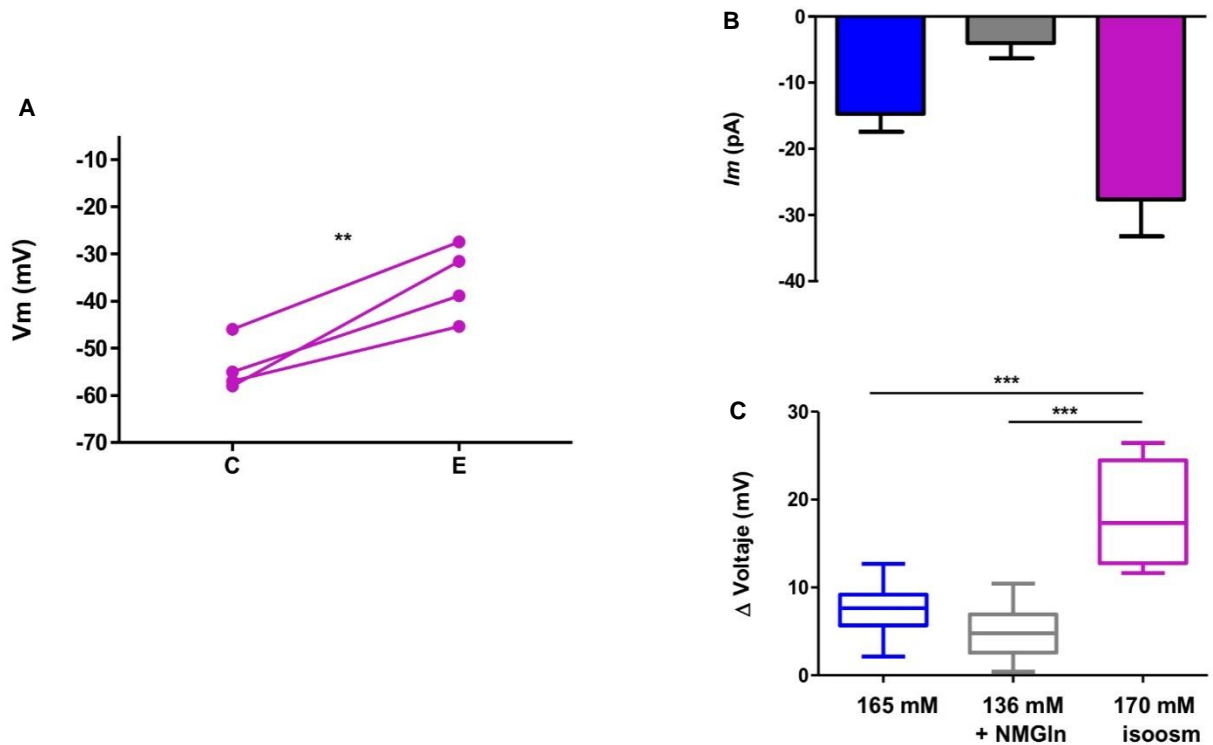


Figura 19. El estímulo hipernatrémico isoosmótico provoca una despolarización de la membrana que coincide con una corriente entrante. A) Despolarización de la membrana provocada por el estímulo alto en Na⁺ isoosmótico. Se observa un cambio significativo al realizar la prueba de *t* Student pareada con una $n=4$ y $p < 0.01$. B) Corriente de entrada. C) Cambio en el voltaje. Estímulo hiperosmótico alto en Na⁺ (azul); el estímulo hiperosmótico con NMGIIn-Cl (gris); y el estímulo alto en Na⁺ isoosmótico (morado). B y C se analizaron con un ANOVA de una vía más la prueba de Tukey.

9 DISCUSIÓN

Con el método de disociación empleado se obtuvieron neuronas magnocelulares del NSO que presentaron diámetros entre 18 y 24 μm . Estas neuronas generan potenciales de acción espontáneos o durante la inyección de corriente despolarizante, de aproximadamente 80 mV pico a pico y en ambos casos presentaron una hiperpolarización pospotencial de acuerdo con Armstrong (1994). En fijación de voltaje, identificamos neuronas oxitocinérgicas y vasopresinérgicas, las primeras presentan una corriente transitoria de potasio del tipo IA, mientras que en la corriente de salida de las segundas, únicamente se observa corriente de potasio tipo IK (rectificador retardado). La presencia de corriente IA, limita el disparo repetitivo de potenciales de acción, por tratarse de una corriente transitoria de signo opuesto a la corriente de Na^+ (Widmer et al., 1997). Las neuronas vasopresinérgicas presentaron disparo espontáneo, una relación I/V lineal y no presentan corriente transitoria de K^+ . En general su actividad espontánea es mayor y presentan disparo repetitivo ante la inyección de corriente despolarizante (Stern & Armstrong en 1995).

Posterior a la identificación, se observó que los dos tipos de neuronas magnocelulares responden a los estímulos hiperosmóticos produciendo una despolarización de la membrana que correlaciona con una corriente entrante. Ambos fenómenos son reversibles al restablecer la osmolaridad normal (Figuras 13-16). Esto ya había sido reportado por Mason en 1980, aunque nuestros resultados sugieren que el estímulo hiperosmótico alto en Na^+ produce una respuesta de mayor magnitud, y fue observado en ambos tipos de neuronas. Nosotros proponemos que esta respuesta se debe a la suma de dos mecanismos, es decir, a la apertura de los TRPV1 por el estímulo hiperosmótico (Naeini et al., 2006) y a la activación de los canales Na_x por el incremento de Na^+ extracelular.

Tratando de determinar el umbral de activación de la respuesta al estímulo hiperosmótico debida al Na^+ , se utilizaron 3 soluciones a las cuales se les aumentó la concentración de NaCl 10, 20 y 30 mM. Se observó que el estímulo con 10 mM más de NaCl y con una osmolaridad de 320 mOsm ya es capaz de provocar la despolarización de la membrana (Figura 17), comparado con la solución control que

tiene 136 mM de Na⁺. Sin embargo, no podemos determinar si esta despolarización se deba al incremento de la concentración de Na⁺ o al estímulo hiperosmótico *per se*. Se requiere utilizar otras soluciones con concentraciones en el rango de 136-146 mM de Na⁺ para determinar el umbral de activación, además de comparar la respuesta con las provocadas por el mismo estímulo hiperosmótico, pero no debido a Na⁺.

Posterior a esto, se decidió comprobar si las neuronas del NSO son capaces de detectar cambios en la [Na⁺]_o mediante el empleo de una solución hipernatrémica isoosmótica, es decir, una solución con una concentración de Na⁺ = 170 mM y con una osmolaridad de 300 mOsm. Esto se logró utilizando citrato de sodio, el cual aporta 2 iones de Na⁺ y genera solamente 3 partículas osmóticamente activas.

Las neuronas del NSO registradas fueron capaces de detectar el incremento de Na⁺ extracelular respondiendo con una despolarización que coincide con una corriente de entrada. Además, se observó que esta despolarización es mayor comparada con la provocada por los estímulos hiperosmóticos. Estos resultados nos sugieren que el incremento en el Na⁺ extracelular, sin aumentar la osmolaridad, activa una corriente que no depende de los TRPV1 y que, probablemente, se deba a la activación de los canales Na_x como ya se ha visto en otros osmorreceptores (Tremblay et al., 2011).

Con base en estos resultados nosotros sugerimos la siguiente dinámica: La Figura 20A es una representación de una neurona magnocelular del NSO la cual expresa TRPV1 y el canal Na_x (Naeini et al., 2006; Néhme et al., 2012). Según lo propuesto por Voisin y colaboradores en 1999, los estímulos hiperosmóticos generan una disminución en el volumen celular, lo que permite que los TRPV1 se activen (Figura 20B) (Voisin et al., 1999; Naeini et al., 2006). Sin embargo, nosotros observamos que la magnitud de la respuesta al estímulo hiperosmótico alto en Na⁺ es mayor que el no debido a Na⁺ proponiendo la activación de dos mecanismos, tanto los TRPV1 por la disminución del volumen celular, como los Na_x por el incremento de Na⁺ extracelular (Figura 20C).

Nuestros resultados también sugieren, como ya lo habíamos mencionado antes, que las neuronas del NSO son capaces de detectar los incrementos en el Na⁺ extracelular sin cambios en la osmolaridad, por la activación de los canales Na_x y no al mecanismo

que involucra a los TRPV1 debido a que no hay cambio en el volumen celular (Figura 20D).

Sin embargo, aún se requiere de más investigación para determinar que esta respuesta se deba a la activación de los canales Na_x .

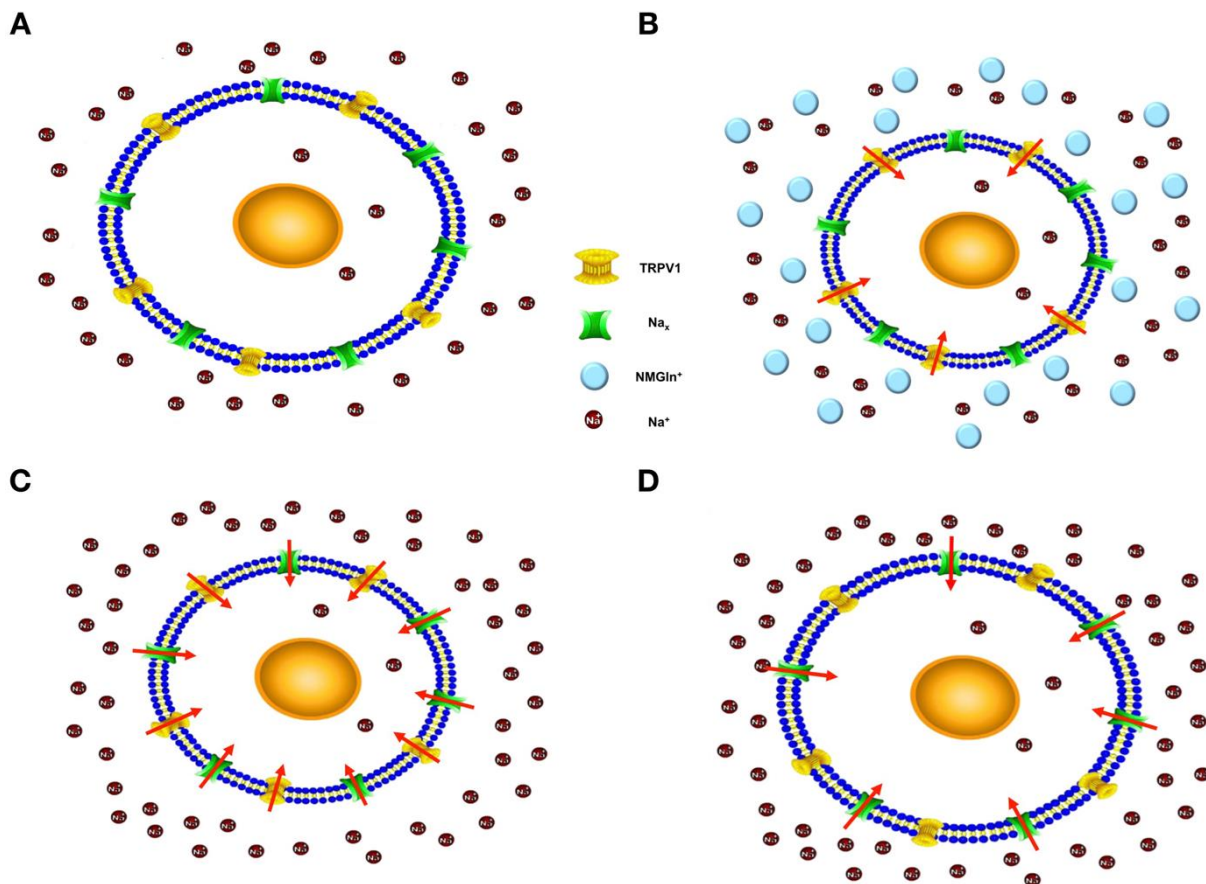


Figura 20. Mecanismos propuestos para el control de la osmolaridad. A) Representación de una neurona magnocelular del NSO, que se sabe expresa canales TRPV1 y Na_x . B) Neurona expuesta a un estímulo hiperosmótico (NMGIn-Cl) que solamente permite la activación de los TRPV1 asociada a la disminución en el volumen celular (mecanismo propuesto por Voisin et al., 1999; Naeini et al., 2006. C) El estímulo hiperosmótico alto en Na^+ provoca la activación de dos tipos de canales: los TRPV1 y los Na_x . D) El incremento de Na^+ extracelular sin cambio en la osmolaridad provoca la activación de los Na_x .

10 CONCLUSIONES

- Se obtuvieron y se pudieron identificar neuronas oxitocinérgicas y vasopresinérgicas del NSO.
- Ambos tipos responden a los estímulos hiperosmóticos con una despolarización de la membrana que coincide con una corriente de entrada.
- La magnitud de la respuesta es mayor con el estímulo hiperosmótico alto en Na^+ debido probablemente, a la suma de dos mecanismos: la activación de los TRPV1 y la activación de los canales Na_x .
- Las neuronas magnocelulares del NSO son capaces de detectar el incremento de Na^+ extracelular que no depende del mecanismo de los TRPV1, y que probablemente se deba a la activación de los canales Na_x .

11 PERSPECTIVAS

- Aislar la corriente Na_x utilizando bloqueadores para los canales de K^+ ; los canales de Na^+ dependientes de voltaje; y los canales de Ca^{2+} .
- Determinar la naturaleza iónica de la respuesta al aumento en la $[\text{Na}^+]_o$ sin cambios en la osmolaridad mediante el empleo de métodos fluorométricos.

12 BIBLIOGRAFÍA

Akopian, A., Souslova, V., Sivilotti, L., & Wood, J. (1997). Structure and distribution of a broadly expressed atypical sodium channel. *Federation of European Biochemical Societies*. 400:183-187.

Armstrong, W., & Stern, J. (1998). Electrophysiological distinctions between oxytocin and vasopressin neurons in the supraoptic nucleus. *Vasopressin and Oxytocin*. 67-77.

Armstrong, W., Foehring, R., Kirchner, M., & Sladek, C. (2019). Electrophysiological properties of identified oxytocin and vasopressin neurones. *Journal of Neuroendocrinology*. 31:1-17.

Armstrong, W., Smith, B., & Tian, M. (1994). Electrophysiological characteristics of immunochemically identified rat oxytocin and vasopressin neurones in vitro. *Journal of Physiology*. 475:115-128.

Bourque, C. (1989). Ionic basis for the intrinsic activation of rat supraoptic neurones by hyperosmotic stimuli. *Journal of Physiology*. 417:263-277.

Bourque, C. (1999). Osmoregulation of vasopressin neurons: A synergy of intrinsic and synaptic processes. *Progress in Brain Research*. 119:59-76.

Bourque, C. (2008). Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nature Reviews Neuroscience*. 9:519-531.

Bourque, C., Oliet, S., & Richard, D. (1994). Osmoreceptors, osmoreception and osmoregulation. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 15:231-274.

Bourque, C., Voisin, D., & Chakfe, Y. (2002). Stretch-inactivated cation channels: cellular targets for modulation of osmosensitivity in supraoptic neurons. *Progress in Brain Research*. 139:85-94.

Brown, C., Bains, J., Ludwig, M., & Stern, J. (2013). Physiological regulation of magnocellular neurosecretory cell activity: Integration of intrinsic, local and afferent mechanisms. *Journal of Neuroendocrinology*. 25:678-710.

Carlisle, D., & Passano, L. (1953). The X-organ of Crustacea. *Nature*. 171:1070-1071.

De Luca, L., Vanderlei, J., & Kim, A. (2014). Neurobiology of body fluid homeostasis: Transduction and integration. *Frontiers in Neuroscience*.

Goldin, A., Barchi, R., Caldwell, J., Hofmann, F., Howe, J., Hunter, J., Kallen, R., Mandel, G., Meisler, M., Netter, Y., Noda, M., Tamkun, M., Waxman, S., Wood, J., & Catterall, W. (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 28:365-368.

Grob, M., Drolet, G., & Mougnot, D. (2004). Specific Na sensors are functionally expressed in a neuronal population of the median preoptic nucleus of the rat. *The Journal of Neuroscience*. 24:3974-3984.

Hayward, J. (1974). Physiological and morphological identification of hypothalamic magnocellular neuroendocrine cells in goldfish preoptic nucleus. *The Journal of Physiology*. 239:103-124.

Hirasawa, M., Mougnot, D., Kozoriz, M., Kombian, S., & Pittman, Q. (2003). Vasopressin differentially modulates non-NMDA receptors in vasopressin and oxytocin neurons in the supraoptic nucleus. *The Journal of Neuroscience*. 23:4270-4277.

Hiyama, T., & Noda, M. (2016). Sodium sensing in the subfornical organ and body-fluid homeostasis. *Neuroscience Research*. 113:1-11.

Hiyama, T., Yoshida, M., Matsumoto, M., Suzuki, R., Matsuda, T., Watanabe, E., & Noda, M. (2013). Endothelin-3 expression in the subfornical organ enhances the sensitivity of Nax, the brain sodium-level sensor, to suppress salt intake. *Cell Metabolism*. 17:507-519.

Hussy, N., Boissin-Agasse, L., Richard, P., & Desarménien, M. (1997). NMDA receptor properties in rat supraoptic magnocellular neurons: Characterization and postnatal development. *European Journal of Neuroscience*. 9:1439-1449.

Hussy, N., Deleuze, C., Desarménien, M., & Moos, F. (2000). Osmotic regulation of neuronal activity: A new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Progress in Neurobiology*. 62:113-134.

- Kandel, E. (1964). Electrical properties of hypothalamic neuroendocrine cells. *The Journal of General Physiology*. 47:691-717.
- Knowles, F., & Carlisle, D. (1956). Endocrine control in the Crustacea. *Biological Reviews*. 31:396-467.
- Leng, G., Brown, C., & Russell, J. (1999). Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. *Progress in Neurobiology*. 57:625-655.
- Liedtke, W., & Friedman, J. (2003). Abnormal osmotic regulation in *trpv4* *-/-* mice. *PNAS*. 100:13698-13703.
- Liedtke, W., Choe, Y., Martí-Renom, M., Bell, A., Denis, C., Sáli, A., Hudspeth, A., Friedman, J., & Heller, S. (2000). Vanilloid receptor–related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*. 103:523-535.
- Matsumoto, M., Hiyama, T., Kuboyama, K., Suzuki, R., Fujikawa, A., & Noda, M. (2015). Channel properties of *nax* expressed in neurons. *PLoS ONE*. 10:1-17.
- Møller, M., Busch, J., Jacobsen, C., Lundemose, S., Lynnerup, N., Rath, M., & Banner, J. (2018). The accessory magnocellular neurosecretory system of the rostral human hypothalamus. *Cell and Tissue Research*. 373:487-498.
- Naeini, R., Witty, M., Séguéla, P., & Bourque, C. (2006). An N-terminal variant of *Trpv1* channel is required for osmosensory transduction. *Nature Neuroscience*. 9:93-98.
- Nehmé, B., Henry, M., Mougnot, D., & Drolet, G. (2012). The expression pattern of the Na^+ sensor, *NaX* in the hydromineral homeostatic network: a comparative study between the rat and mouse. *Frontiers in Neuroanatomy*. 6:1-18.
- Noda, M. (2007). Hydromineral neuroendocrinology: mechanism of sensing sodium levels in the mammalian brain. *Experimental Physiology*. 92:513-522.
- Noda, M., & Himaya, T. (2015). The *Nax* channel: What it is and what it does. *The Neuroscientist*. 21:399-412.
- Noda, M., & Hiyama, T. (2005). Sodium-level-sensitive sodium channel and salt-intake behavior. *Chemical Senses*. 30:44-45.

- Noda, M., & Sakuta, H. (2013). Central regulation of body-fluid homeostasis. *Trends in Neurosciences*. 36:661-673.
- Ogata, N., & Ohishi, Y. (2002). Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 88:365-377.
- Oliet, S., & Bourque, C. (1992). Properties of supraoptic magnocellular neurons isolated from the adult rat. *Journal of Physiology*. 455:291-306.
- Prager-Khoutorsky, M., & Bourque, C. (2015). Mechanical basis of osmosensory transduction in magnocellular neurosecretory neurones of the rat supraoptic nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*. 27:507-515.
- Prager-Khoutorsky, M., Khoutorsky, A., & Bourque, C. (2014). Unique interweaved microtubule scaffold mediates osmosensory transduction via physical interaction with TRPV1. *Neuron*. 83:866-878.
- Richard, D., & Bourque, C. (1995). Synaptic control of rat supraoptic neurones during osmotic stimulation of the organum vasculosum lamina terminalis in vitro. *Journal of Physiology*. 489:567-577.
- Shimizu, H., Watanabe, E., Hiyama, T., Nagakura, A., Fujikawa, A., Okado, H., Yanagawa, Y., Obata, K., & Noda, M. (2007). Glial Na^x channels control lactate signaling to neurons for brain [Na⁺] sensing. *Neuron*. 54:59-72.
- Squire, L., Bloom, F., McConnel, S., Roberts, J., Spitzer, N., & Zigmond, M. (2003). *Fundamental Neuroscience. Second Edition. Academic Press*. 1011-1020 pp.
- Stern, J., & Armstrong, W. (1995). Electrophysiological differences between oxytocin and vasopressin neurones recorded from female rats in vitro. *Journal of Physiology*. 488:701-708.
- Tremblay, C., Berret, E., Henry, M., Nehmé, B., Nadeau, L., & Mougnot, D. (2011). Neuronal sodium leak channel is responsible for the detection of sodium in the rat median preoptic nucleus. *Journal of Physiology*. 105:650-660.

- Vasilyev, A., Indyk, E., & Rakowsky, R. F. (2002). Properties of sodium channels Nax activated for strong depolarization of *Xenopus* oocytes. *Journal Membrane Biology*. 185: 237-247.
- Veelaert, D., Schoofs, L., & Loof, A. (1998). Peptidergic control of the corpus cardiacum-corpora allata complex of locusts. *International Review of Cytology*. 182:249-302.
- Velasco, B., Erlick, T., Shy, D., Sclafani, J., Lipshitz, H., McInnes, R., & Hartenstein, V. (2007). Specification and development of the pars intercerebralis and pars lateralis, neuroendocrine command centers in the *Drosophila* brain. *Developmental Biology*. 302:309-323.
- Voisin, D., Chakfe, Y., & Bourque, C. (1999). Coincident detection of CSF Na⁺ and osmotic pressure in osmoregulatory neurons of the supraoptic nucleus. *Neuron*. 24:453-460.
- Watanabe, E., Fujikawa, A., Matsunaga, H., Yasoshima, Y., Sako, N., Yamamoto, T., Saegusa, C., & Noda M. (2000). Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. *The Journal of Neuroscience*. 20:7743-7751.
- Wilmer, H., Boissin-Agasse, L., Richard, P., & Desarmenién, M. 1997. Differential distribution of a potassium current in immunocytochemically identified supraoptic magnocellular neurones of the rat. *Neuroendocrinology*. 65:229-237.