



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y
NEUROCIENCIAS

**Papel funcional de los canales Nax en las células neurosecretoras
magnocelulares del núcleo supraóptico de la rata**

TESIS

Que presenta

M. C. Sandra Jocelin Salgado Mozo

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directores de tesis

Dr. Ubaldo García Hernández

Dr. Charles Bourque

Ciudad de México

Diciembre, 2023

COMITÉ TUTORAL

Director de tesis:
Dr. Ubaldo García Hernández
Investigador Cinvestav
Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
ugarcia@fisio.cinvestav.mx

Director de tesis:
Dr. Charles Bourque
James McGill Professor
Centre for Research in Neuroscience
charles.bourque@mcgill.ca

Asesor:
Dr. Jorge Noel Quevedo Durán
Investigador Cinvestav
Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
jquevedo@fisio.cinvestav.mx

Asesor:
Dr. José Antonio Arias Montaña
Investigador Cinvestav
Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
jaarias@fisio.cinvestav.mx

Asesor:
Dr. Agustín Guerrero Hernández
Investigador Cinvestav
Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
aguerrero@cinvestav.mx

“Agradezco el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por haberme otorgado la beca número 756608 durante el período de octubre del 2019 a agosto del 2023 para la realización de mis estudios de doctorado que concluyen con esta tesis”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de tesis el doctor Ubaldo García, por su apoyo en esta etapa; por compartirme sus conocimientos en la ciencia, y cultivarme en otros temas culturales. Asimismo, estoy muy agradecida con el doctor Charles Bourque por aceptarme en su laboratorio; por confiar en mí; por su positivismo, y por todo el apoyo recibido cuando las condiciones globales en la ciencia fueron afectadas por una pandemia.

Agradezco a mis asesores, los doctores José Antonio, Jorge Quevedo y Agustín Guerrero, por sus comentarios, correcciones, consejos, interés, y su tiempo invertido en este proyecto.

Agradezco a mis papás y hermanas por soportarme en cada etapa del doctorado; por su apoyo y amor incondicional.

Agradezco a mis compañeros y amigos del CINVESTAV siempre interesados y orgullosos por los logros conseguidos durante este tiempo, lo cual es mutuo.

Agradezco a mis compañeros y amigos de Bourque Lab de quienes aprendí y recibí mucho apoyo. Además, lograron que mi estancia en Canadá fuera lo más agradable posible.

Finalmente, agradezco a la vida por ponerme en el lugar y tiempo correcto para que todo esto sucediera.

***“pensar en uno mismo es una
muestra de egoísmo. Algo propio
de los pobres de espíritu”***

[Svetlana Aleksievich. Voces de Chernobil]

ABREVIATURAS

[Na⁺]_i concentración intracelular de sodio

[Na⁺]_o concentración extracelular de sodio

ΔN-TRPV1 Variante en el amino terminal del receptor de potencial transitorio tipo V1

AVVs Adenoasociados

BZ Benzamil (Bloqueador de los canales de Na⁺ epiteliales)

ENaCs Canales de sodio epiteliales

MNC Célula neurosecretora magnocelular

MnPO Núcleo Preóptico Medial

OT Oxitocina

OVLT Órgano vascular de la lamina terminal

PVN Núcleo paraventricular

SB SB-366791 (Antagonista de los TRPV1)

sCVOs Órganos circunventriculares sensoriales

SFO Órgano subfornical

SON Núcleo supraóptico

TTX Tetrodotoxina (Bloqueador de los VGSCs)

VGSCs Canales de sodio dependientes de voltaje

VP Vasopresina

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Figura 1 La homeostasis de los fluidos extracelulares involucra la osmorrepción y la detección de Na⁺	4
Figura 2 Complejo osmorreceptor central.	5
Células neurosecretoras magnocelulares	5
Detección osmótica	6
Figura 3 Las MNCs son osmorreceptores.	7
Figura 4 Los estímulos hipertónicos activan canales TRPV1 en las MNCs.	8
Detección de Na⁺	9
Figura 5 Las MNCs expresan diferentes canales catiónicos permeables a Na⁺.	9
Figura 6 [Na⁺]_o es detectada por las células disociadas del SFO que expresan el canal Na_x.	10
Canales de Na⁺ epiteliales (ENaCs)	10
Figura 7 La dieta alta en Na⁺ afecta el potencial de membrana en reposo a través de los ENaCs.	11
Canal Na_x	12
Figura 8 El canal Na_x es diferente a los otros canales de la familia.	12
Figura 9 El canal Na_x interactúa con la isoforma α1 de la Na⁺/K⁺ATPasa.	13
JUSTIFICACIÓN	14

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	14
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Drogas y anticuerpos	16
Registros electrofisiológicos en rebanadas	17
Soluciones	18
Preparación de células aisladas	18
Electrofisiología en MNCs aisladas	19
Inmunohistoquímica	20
Silenciamiento del canal Nax medido por AAV en las MNCs del SON	20
Análisis de c-fos	21
Análisis estadístico	22
RESULTADOS	23
Las MNC^{OT} y MNC^{VP} de hembras y machos responden igualmente al estímulo hipernatrémico-isoosmótico	23
Tabla 1. Composición de las soluciones usadas en rebanadas	24
Figura 10 Efectos del aumento en la $[Na^+]_o$ sobre las MNC^{OT} y las MNC^{VP} de ratas hembra y macho.	26
La magnitud de la respuesta al estímulo hipernatrémico isoosmótico depende de la $[Na^+]$	27
Figura 11 Las MNCs responden a los cambios fisiológicos de la $[Na^+]_o$.	29
El canal Nax está expresado en las MNC^{OT} y las MNC^{VP}, pero no se encuentra expresado en astrocitos	29

Figura 12 El canal Nax se expresa en ambas MNCs, pero no se expresa en los astrocitos del SON de rata.	30
Las MNCs aisladas responden al estímulo hipernatrémico isoosmótico ..	31
Figura 13 Efectos del alto Na^+ en MNCs aisladas.	32
Figura 14 La corriente inducida por alto Na^+ no se afecta por el bloqueo de los VGSCs, Trpv1 o ENaCs.	33
Figura 15 La reducción de la expresión del <i>Scn7a</i> desmejora la respuesta de la corriente entrante al incremento en la $[Na^+]_o$.	35
La expresión del canal Nax contribuye en la detección de la hipernatremia, pero no en la detección de la hipertonicidad <i>in vivo</i>	36
Figura 16 El silenciamiento de <i>Scn7a</i> en las MNCs afecta la respuesta a los niveles elevados de Na^+ sistémicos <i>in vivo</i>.	38
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIÓN	43
Figura 17 Detección de Na^+ por las MNCs.	43
BIBLIOGRAFÍA	44

RESUMEN

El gen *Scn7A* codifica para Na_x , un canal de sodio no-inactivante atípico, el cual se expresa en los órganos circunventriculares sensoriales para mantener la homeostasis de los fluidos corporales. Además, el canal Na_x también ha sido detectado en las neuronas efectoras homeostáticas, como las neuronas magnocelulares vasopresinérgicas (MNC^{VP} , por sus siglas en inglés), las cuales secretan vasopresina (VP, hormona antidiurética) en el torrente sanguíneo en respuesta a la hipertonicidad e hipernatremia. Este canal es estructuralmente homólogo a los canales de sodio dependientes de voltaje (VGSCs) y se diferencia de los otros miembros de la familia en regiones clave como el sensor de voltaje, los mecanismos de activación e inactivación y la sensibilidad a la tetrodotoxina. En el presente trabajo, demostramos que las MNC^{VP} expresan canales Na_x . Sorprendentemente, las MNC^{VP} responden a un estímulo hipernatrémico-isoosmótico con una despolarización que aumenta su frecuencia de disparo. Esta despolarización se correlaciona temporalmente con una corriente de entrada cuyo potencial de inversión corresponde al potencial de equilibrio del Na^+ . La corriente Na_x no fue afectada cuando se aisló bloqueando otras vías de permeabilidad al Na^+ que están presentes en las MNC^{VP} , pero se redujo significativamente mediante el silenciamiento de la expresión del *Scn7A*. Asimismo, la reducción selectiva de los canales Na_x afectó la activación de las MNCs en condiciones de hipernatremia sistémica sin afectar la respuesta a la hipertonicidad *in vivo*. Estos datos sugieren un papel funcional de los canales Na_x en la detección de Na^+ por parte de las MNC^{VP} .

ABSTRACT

The *Scn7A* gene encodes Na_x , an atypical non-inactivating Na^+ channel which is expressed in sensory circumventricular organs that plays an essential role in body fluids homeostatic responses. However, Na_x is also expressed in homeostatic effector neurons, such as vasopressin (VP) releasing magnocellular neurosecretory cells (MNC^{VP}) which secrete VP (antidiuretic hormone) into the bloodstream in response to hypertonicity or hypernatremia. This channel is structural homologous of the voltage-gated sodium channels (VGSCs) and differs from the other family members in key regions as the voltage sensor, activation, and inactivation mechanisms and tetrodotoxin sensitivity. In the present work, we demonstrated that MNC^{VP} express Na_x channels. Surprisingly, MNC s respond to a hypernatremic–isoosmotic stimulus with a depolarisation that increases their firing rate. This depolarisation temporally correlates with an inward current whose reversal potential corresponds to the equilibrium potential for Na^+ . The Na^+ -evoked current was unaffected by blockers of other Na^+ -permeable ion channels but was significantly reduced by shRNA-mediated knockdown of *Scn7A* expression. Furthermore, reducing the density of Na_x channels selectively impaired the activation of MNC^{VP} by hypernatremia without affecting their responsiveness to hypertonicity *in vivo*. These data suggest that Na_x channels have a functional role in the homeostatic hypernatremic response of MNC^{VP} .

INTRODUCCIÓN

La osmorregulación sistémica es un proceso vital por el cual la concentración total de solutos extracelulares (osmolaridad) es mantenida dentro de un rango fisiológico. Cambios en la osmolaridad del plasma son detectados, a nivel central, por osmorreceptores “neuronas especializadas capaces de transducir los cambios osmóticos en señales eléctricas” (Bourque, 2008). Debido a que el sodio (Na^+) es el catión principal en los fluidos corporales y determinante de la osmolaridad, su homeostasis es crucial para la vida. Se sabe que los incrementos en los niveles de Na^+ en el plasma aumentan la osmolaridad de este mismo. Los mecanismos efectores involucrados en la osmorregulación incluyen el control de la ingesta de agua y Na^+ , así como la liberación de hormonas que regulan la excreción de estos mismos, a través del riñón (Denton et al., 1996; Bourque, 2008; Zimmerman et al., 2017; Gizowski and Bourque, 2018). Estudios previos han identificado neuronas y vías cerebrales que forman componentes específicos en la red osmoreguladora. Por ejemplo, las células magnocelulares neurosecretoras de vasopresina (MNC^{VP}) y oxitocina (MNC^{OT}), de los núcleos supraóptico (SON) y paraventricular (PVN), son neuronas efectoras que median la antidiuresis (retención de agua) (Robertson et al., 1976) y la natriuresis (excreción de Na^+) (Huang et al., 1995), respectivamente (Figura 1).

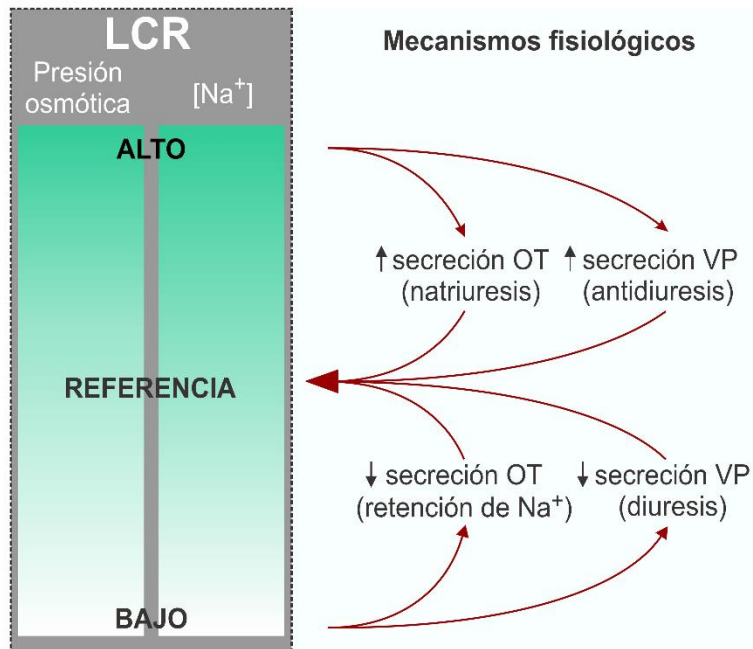


Figura 1 | **La homeostasis de los fluidos extracelulares involucra la osmorrecepción y la detección de Na^+ .** Los cambios en la $[\text{Na}^+]_o$ del líquido cefalorraquídeo (LCR) inducen las respuestas homeostáticas que afectan la osmolalidad y el balance de agua. Modificada de (Voisin and Bourque, 2002; Bourque, 2008).

Además, la concentración extracelular de Na^+ ($[\text{Na}^+]_o$) es continuamente monitoreada en el cerebro para mantenerla dentro del rango fisiológico 135-145 mM (Peruzzo et al., 2010). Este monitoreo central de las condiciones de los fluidos corporales es mediado por los órganos circunventriculares sensoriales (sCVOs), que son regiones en el cerebro que carecen de barrera hematoencefálica (McKinley et al., 2003). Los sCVOs están situados en las paredes del tercer y cuarto ventrículo lo cual les permite estar en contacto con los fluidos extracelulares a través de una capa simple de células endodiales. Estas células tienen estructuras características de redes capilares permeables que facilitan la penetración al tejido para monitorear las sustancias circulantes (Johnson and Gross, 1993). Los sCVOs están conformados por el órgano subfornical (SFO), el órgano vascular de la lámina terminal (OVLT) y el área postrema (AP). La información del estado de los fluidos corporales ingresa tanto en el OVLT como en el SFO que forman parte del complejo

osmorreceptor central (Figura 2). Algunas de las neuronas presentes en el SFO y el OVLT son osmorreceptores, lo cual significa que incrementan su actividad eléctrica en respuesta al aumento en la tonicidad (McKinley et al., 2003; Johnson, 2007), mientras que las MNCs son la vía final para la homeostasis de los fluidos extracelulares a nivel central (Bourque, 2008).

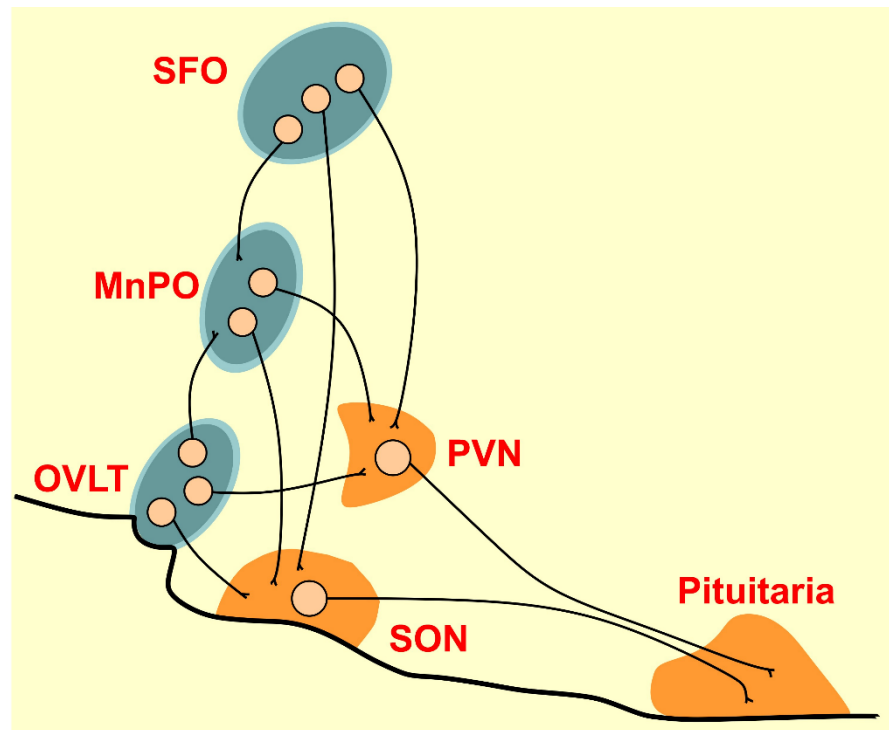


Figura 2 | **Complejo osmorreceptor central.** La información de la osmolalidad es detectada por el órgano subfornical (SFO) y el órgano vascular de la lámina terminal OVLT, para después ser enviada a las neuronas efectoras de los núcleos supraóptico (SON) y paraventricular (PVN) directa o indirectamente a través del núcleo preóptico medial (MnPO). Finalmente, las células neurosecretoras magnocelulares (MNCs) proyectan sus axones a la pituitaria posterior donde se libera oxitocina (OT) y vasopresina (VP). Modificada de (Hussy et al., 2000).

Células neurosecretoras magnocelulares

Las neuronas magnocelulares, del SON y PVN, sintetizan y secretan VP y OT. Estas MNCs envían sus axones a la neurohipófisis formando el sistema hipotálamo-neurohipófisis. En este sistema, los potenciales de acción generados

en el soma de las MNCs resultan en la liberación de las hormonas que pasan a la circulación general para actuar sobre sus órganos blancos en respuesta a diferentes estímulos como cambios en la presión sanguínea, la homeostasis de fluidos, el parto y la lactancia (Armstrong, 1995; Hussy et al., 2000).

Las MNC^{VP} y MNC^{OT} comparten propiedades electrofisiológicas como la resistencia de entrada, el tamaño y duración de los potenciales de acción y la hiperpolarización pospotencial (Armstrong et al., 1994). Además, ambos tipos de MNCs muestran propiedades similares como la presencia de sinapsis de tipo somato-dendríticas (Andrew et al., 1981; Hirasawa et al., 2003) y su osmosensibilidad intrínseca (Mason, 1980; Bourque and Renaud, 1984).

Detección osmótica

Estudios previos han mostrado que el control osmótico por las MNCs involucra mecanismos sinápticos e intrínsecos. Se sabe, gracias a los experimentos electrofisiológicos de Richard y Bourque (1995), que las neuronas del OLVT envían proyecciones al SON para regular la actividad eléctrica de las MNCs a través de la transmisión sináptica (Figura 3A-B). Además, Oliet y Bourque (1992) reportaron que las MNCs son osmorreceptores *per se*, debido a que ellas se despolarizan en presencia de estímulos hipertónicos. La capacidad de las MNCs para detectar estos cambios se debe al incremento de la conductancia de entrada por la apertura de canales catiónicos que no están involucrados con la generación del potencial de acción (Figura 3). Estudios posteriores demostraron que estos canales catiónicos son codificados como una variante en el amino terminal del receptor de potencial transitorio tipo V1 (Δ N-TRPV1). Asimismo, se demostró, que las neuronas aisladas del SON de ratones transgénicos que no expresan TRPV1 carecen de respuesta al ser expuestas a estímulos hipertónicos o estrechamiento de la membrana inducido por succión (Sharif Naeini et al., 2006; Zaelzer et al., 2015).

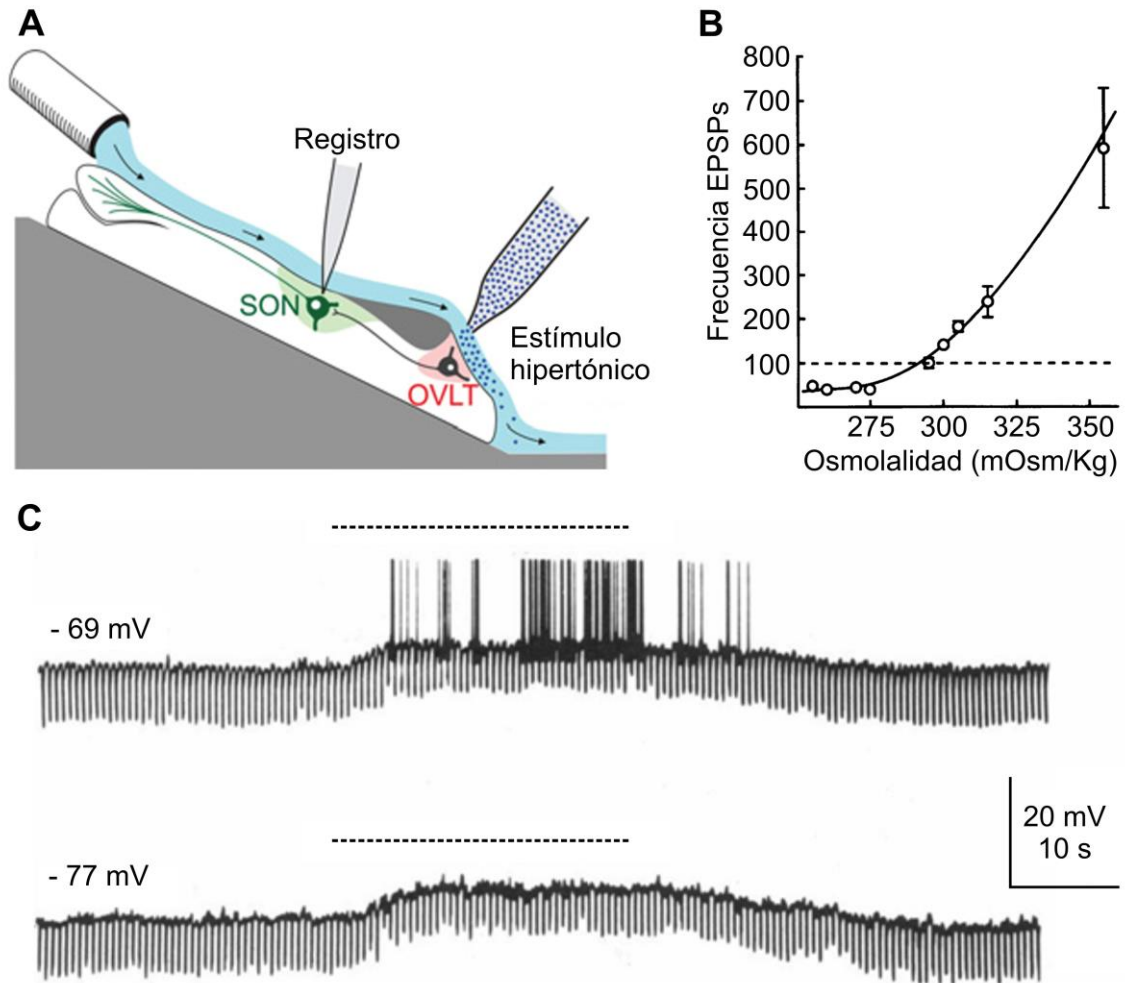


Figura 3 | **Las MNCs son osmorreceptores.** A) Diagrama del explante hipotalámico que contiene al SON y al OVLT. B) La gráfica muestra la relación entre la frecuencia de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) de las MNCs del SON y la osmolalidad del fluido extracelular aplicado al OVLT. C) Ambos trazos muestran el potencial de membrana y las respuestas de la conductancia de las MNCs expuestas a un estímulo hipertónico (+30 mOsm/Kg, línea punteada). El estímulo evoca una despolarización de la membrana alcanzado el umbral de activación de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, lo cual permite el disparo de potenciales de acción (trazo superior). Las deflexiones negativas son las respuestas de voltaje provocadas por pulsos de corrientes hiperpolarizantes de la misma amplitud. La reducción en la magnitud de las deflexiones indica un incremento en la conductancia cuando las MNCs son expuestas al estímulo hipertónico. (Oliet and Bourque, 1992; Bourque et al., 1994).

Brevemente, el mecanismo de activación de estos canales es el siguiente: TRPV1 interactúa con los microtúbulos debido a que poseen motivos de β -tubulina en su carboxilo terminal (Goswami et al., 2004; Goswami and Hucho, 2008). En presencia de un estímulo hipertónico, las MNCs responden con un encogimiento de su membrana lo cual resulta en la aplicación de una presión por parte de los microtúbulos sobre los canales TRPV1 y de algún modo permiten su activación (Figura 4). Por otro lado, un estímulo hipotónico evoca un hinchamiento y desactivación de los canales TRPV1 (Prager-Khoutorsky et al., 2014; Prager-Khoutorsky and Bourque, 2015). Estudios posteriores, demostraron un incremento en la densidad de microtúbulos en animales con carga de sal, lo cual es suficiente para mejorar la osmosensibilidad (Hicks et al., 2020). Todo esto sugiere que la interacción entre los microtúbulos y la Δ N-TRPV1 es necesaria para la respuesta autónoma a los cambios en la osmolaridad del plasma.

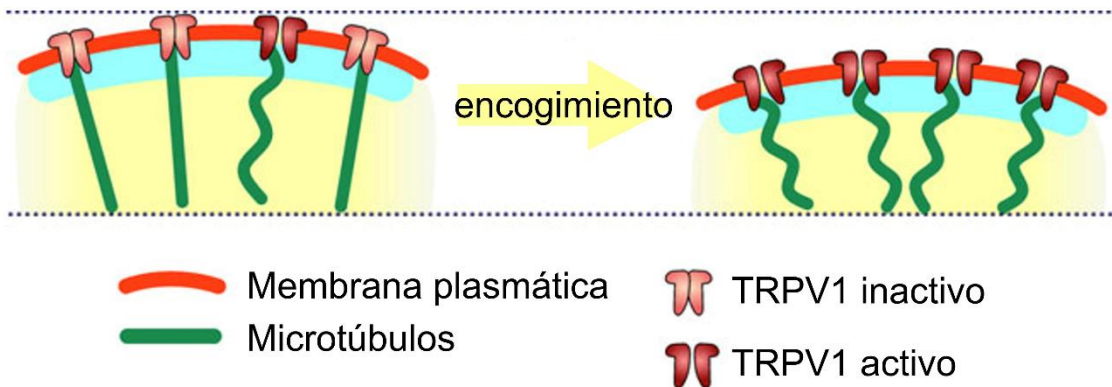


Figura 4 | **Los estímulos hipertónicos activan canales TRPV1 en las MNCs.** En condiciones control los canales TRPV1 están unidos a los microtúbulos, pero solo unos pocos se encuentran activos (izquierda). El estímulo hipertónico evoca un encogimiento de la membrana incrementado la activación de los TRPV1 (derecha). Modificado de (Prager-Khoutorsky et al., 2014; Prager-Khoutorsky and Bourque, 2015).

Los mecanismos sinápticos e intrínsecos, descritos arriba, explican cómo las MNCs responden a los cambios en la osmolaridad. Sin embargo, no explican cómo los cambios en la $[Na^+]_o$ pueden ser detectados independientemente de los cambios osmóticos. Además, estudios previos han sugerido la existencia de detectores de

Na⁺ cerebrales (Olsson, 1969; Olsson and Kolmodin, 1974). Sin embargo, cómo las MNCs pueden específicamente detectar los cambios de [Na⁺]_o aún no está claro.

Detección de Na⁺

En teoría, las MNCs podrían detectar incrementos en la [Na⁺]_o a través de efectos despolarizantes por un aumento en una corriente entrante de fuga asociado con un incremento en la fuerza motora a través de canales permeables a Na⁺ (es decir, V_m-E_{Na}). Estudios previos han demostrado que las MNCs expresan varios tipos de canales permeables a Na⁺, incluyendo a los canales de Na⁺ epiteliales (ENaCs) (Teruyama *et al.*, 2012), canales iónicos sensibles a pH (ASICs) (Ohbuchi *et al.*, 2010), y canales de Na⁺ dependientes de voltaje (VGSCs) (Waxman *et al.*, 2000; Black *et al.*, 2014) (Figura 5).

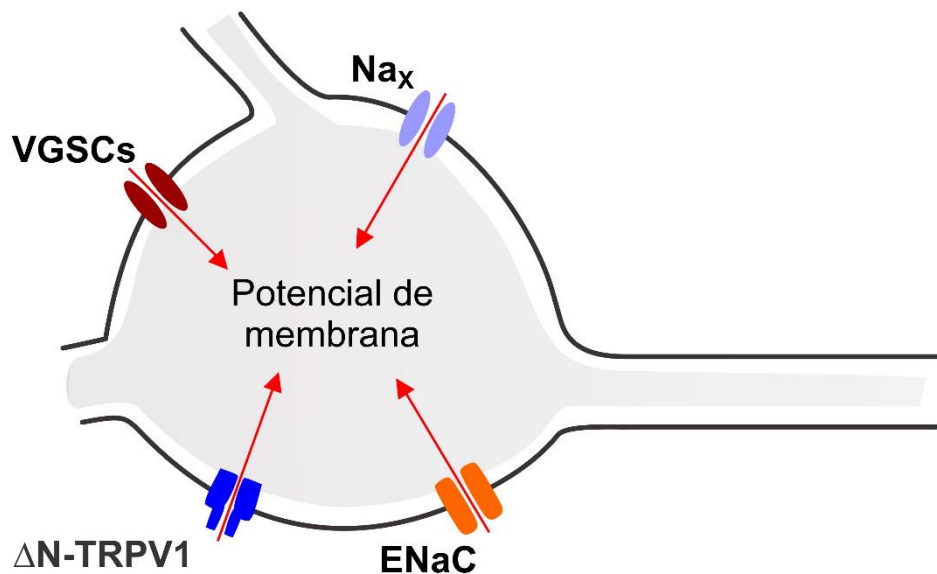


Figura 5 | **Las MNCs expresan diferentes canales catiónicos permeables a Na⁺.** Los cambios en la [Na⁺]_o pueden ser detectados por diferentes mecanismos presentes en las MNCs (TRPV1, VGSC, ENaC y canales Na_x). Modificado de (Voisin and Bourque, 2002).

Estudios recientes muestran que las células aisladas del SFO responden a la elevación de la $[Na^+]_o$ incrementando la concentración de Na^+ intracelular ($[Na^+]_i$), probablemente como resultado de un influjo de Na^+ (Hiyama et al., 2002; Noda and Hiyama, 2005). Además, se ha demostrado que esta respuesta se debe a la expresión del canal Na_x , un canal atípico de Na^+ el cual opera como un detector específico de este ion. Interesantemente, ha sido reportado que los ratones transgénicos que no expresan el canal Na_x no paran de ingerir sal incluso en condiciones de deshidratación, mientras que los que los ratones que sí expresan el canal suprimen este comportamiento, indicando que este canal es requerido para la homeostasis de Na^+ (Watanabe et al., 2000; Hiyama et al., 2004).

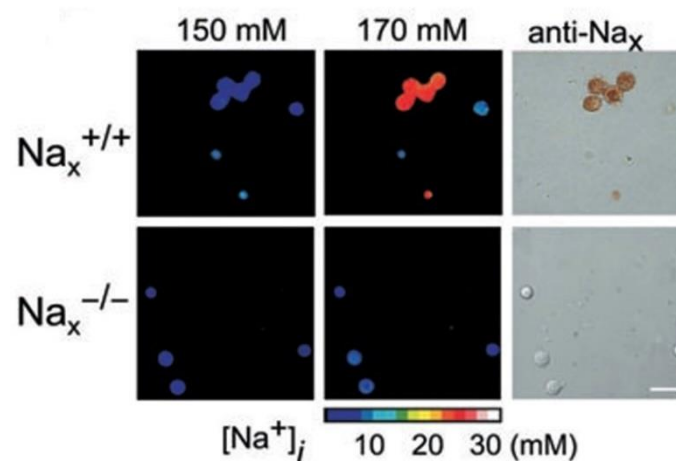


Figura 6 | $[Na^+]_o$ es detectada por las células dissociadas del SFO que expresan el canal Na_x . Usando un indicador fluorescente de Na^+ , las neuronas obtenidas de ratones control ($Na_x^{+/+}$) y transgénicos que no expresan canales Na_x ($Na_x^{-/-}$), fueron expuestas a un estímulo hipernatrémico ($[Na^+]_o$ de 150 a 170 mM). Las neuronas de los ratones $Na_x^{+/+}$ responden al estímulo hipernatrémico con un incremento en la $[Na^+]_i$ (imágenes de arriba), mientras que las neuronas de los ratones $Na_x^{-/-}$ no generaron una respuesta al mismo estímulo (imágenes de abajo) (Noda and Hiyama, 2005).

Canales de Na^+ epiteliales (ENaCs)

Los ENaCs son canales sensibles a amilorida, no dependen del voltaje y poseen una permeabilidad selectiva a Na^+ . Están formados por tres subunidades

(α , β y γ), todas expresadas en las MNCs del SON. Se ha reportado que el uso de un potente bloqueador selectivo de estos canales (benzamil), produce el bloqueo de una corriente de fuga que afecta el potencial de membrana de las MNCs (Figura 7A), sugiriendo que los ENaCs contribuyen al potencial de membrana en reposo de estas neuronas. Además, las MNCs de ratones expuestos a una dieta alta en Na^+ muestran un incremento en la expresión de los ENaCs en la membrana (Figura 7B), lo cual provoca una despolarización de estas neuronas en estado estable (Figura 7C) (Teruyama et al., 2012; Sharma et al., 2017).

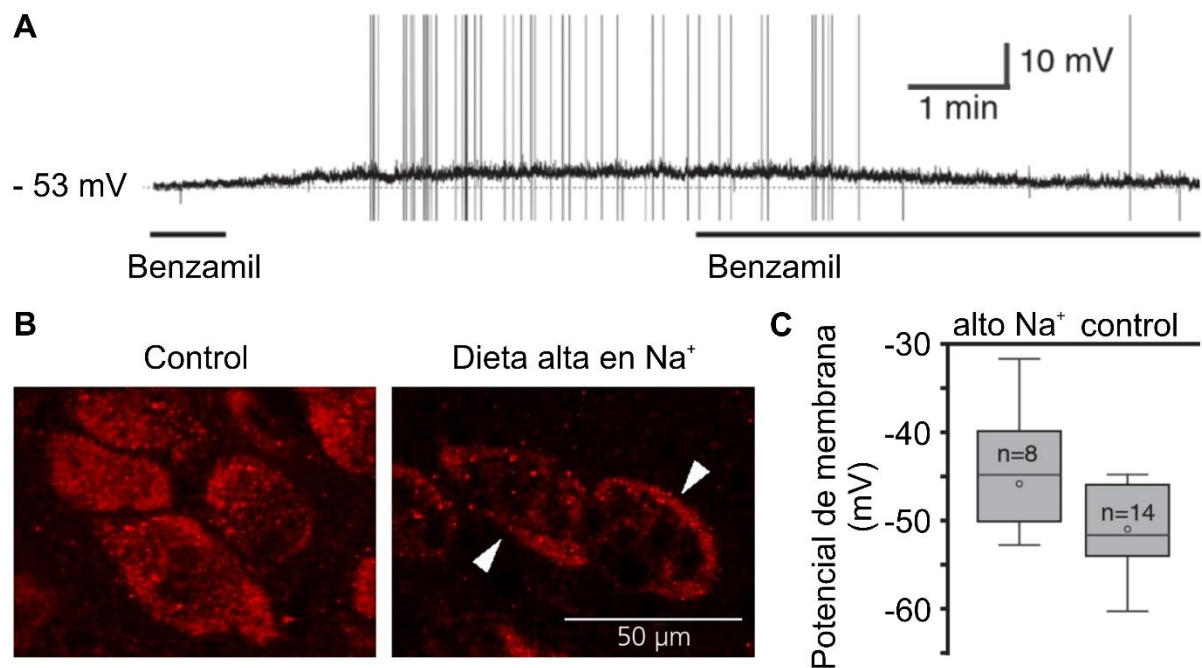


Figura 7 | **La dieta alta en Na^+ afecta el potencial de membrana en reposo a través de los ENaCs.** A) Registro en fijación de corriente de una MNC. La presencia de benzamil provoca hiperpolarización por el bloqueo de la corriente de fuga de los ENaCs. B) Las micrografías muestran la expresión de los ENaCs en las MNCs del SON de ratas expuestas a una dieta control (izquierda), y una dieta alta en Na^+ (derecha) por 7 días. C) La grafica muestra el promedio del potencial de membrana de las MNCs del SON expuestos a una dieta alta en Na^+ comparados con la dieta control. Modificada de (Sharma et al., 2017).

Canal Na_x

Los VGSCs son elementos críticos para la iniciación y propagación de los potenciales de acción en las células excitables. Ellos son responsables de la despolarización inicial de la membrana y el rápido ascenso del potencial de acción. Una variedad de diferentes canales de Na⁺ ha sido identificada por técnicas electrofisiológicas, purificación bioquímica y biología molecular. Muchas de las isoformas identificadas en mamíferos presentan más del 50 % de homología en la secuencia de aminoácidos a excepción del canal Na_x. Éste comparte menos del 50 % de identidad de secuencia con otros miembros de la familia de VGSC (Figura 8A), no depende del voltaje y es resistente a tetrodotoxina (TTX). Además, el segmento S4 de los canales Na_x posee menos residuos de aminoácidos con carga positiva comparados con otros miembros de la familia (Figura 8B). También, el interdominio III-IV está pobremente conservado (Goldin et al., 2000).

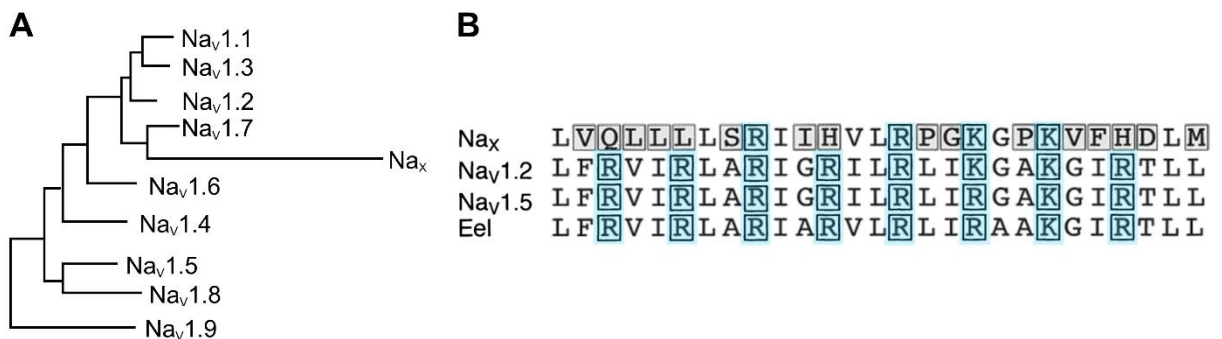


Figura 8 | **El canal Na_x es diferente a los otros canales de la familia.** A) Relaciones filogenéticas de los VGSCs de rata. B) La secuencia de aminoácidos del segmento S4 del canal Na_x, comparado con otros canales de la familia (Nav1.2, Nav1.5) y con el canal de Na⁺ dependiente de voltaje de la anguila eléctrica (Eel), posee menos aminoácidos cargados positivamente (sombra azul). Modificado de (Goldin et al., 2000; Ogata and Ohishi, 2002).

Estudios recientes han demostrado que los canales Na_x requieren de la isoforma α1 de la Na⁺/K⁺ATPasa, formando un complejo funcional localizado cerca de la membrana e importante para la regulación de la [Na⁺]_o en el MnPO (Shimizu et al.,

2007; Berret et al., 2013) (Figura 9). Asimismo, usando la línea celular Neuro2A que expresan canales Na_x , se ha sugerido que en un ambiente hipernatrémico aumenta la actividad del complejo Na_x - Na^+/K^+ ATPasa por incremento en su tasa expresión y colocalización (Berret et al., 2014).

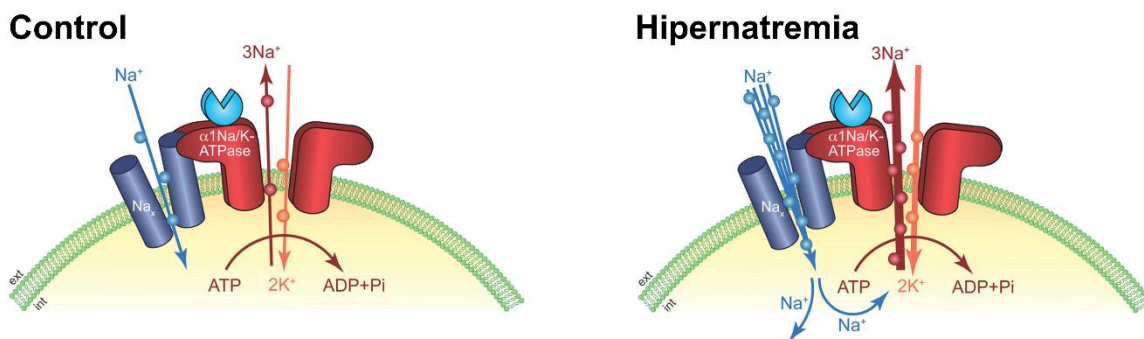


Figura 9 | **El canal Na_x interactúa con la isoforma $\alpha 1$ de la Na^+/K^+ ATPasa.** El complejo Na_x - Na^+/K^+ ATPasa en las neuronas del MnPO en condiciones control (izquierda) y en condiciones de hipernatremia (derecha). El diagrama propone un enlace funcional de la integración local de la entrada y salida de Na^+ en ambas condiciones (Shimizu et al., 2007; Berret et al., 2013).

Por otro lado, un estudio reciente indicó que el canal Na_x regula la actividad de los ENaCs en tejido epitelial, específicamente en cicatrices hipertróficas donde la $[\text{Na}^+]_o$ es alta. Se demostró que este incremento es detectado por los canales Na_x . Seguido de esto, la actividad de los canales Na_x provocó un aumento en la $[\text{Na}^+]_i$, la cual a su vez regula a la prostatina (una proteína anclada a glicofosfatidilinositol, involucrada en la vía de señalización para activar a los ENaCs), que es liberada en el espacio extracelular permitiendo la activación de los ENaCs por la ruptura del asa extracelular de la subunidad γ (Xu et al., 2015; Dolivo et al., 2021). Estos resultados indican que los canales Na_x juegan un papel importante en la homeostasis del Na^+ a través del control de los canales ENaCs en tejido epitelial.

Todos estos descubrimientos, descritos antes, nos sugieren que el canal Na_x puede jugar un papel importante en la detección del Na^+ a nivel central. Es entonces posible que este canal contribuya a la detección de Na^+ por las MNCs.

JUSTIFICACIÓN

Se sabe que el canal Nax está expresado en las estructuras que detectan la $[Na^+]_o$ como el OVLT, el SFO y el MnPO, incluyendo también al SON y el PVN (Nehme et al., 2012). Sin embargo, el papel funcional de estos canales en las MNCs del SON aún no ha sido estudiado. En este trabajo, se investigó si estos canales modulan la excitabilidad de las MNCs en respuesta a diferentes estímulos de Na^+ .

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Pueden los canales Nax , expresados en las MNCs, mediar la despolarización y excitación de estas células en respuesta a un incremento en la $[Na^+]_o$? Si esto sucede, ¿cuál es el papel fisiológico de los canales Nax en la detección de Na^+ en condiciones de hipernatremia?

HIPÓTESIS

Los canales Nax que están presentes en las MNCs del SON pueden detectar la $[Na^+]_o$, sin cambios en la osmolaridad, generando una corriente de entrada que despolariza el potencial de membrana e incrementando la excitabilidad neuronal.

OBJETIVOS

General

- Determinar el rol funcional de los canales Nax en las MNCs del SON.

Específicos

- Determinar la respuesta electrofisiológica de las MNCs a un incremento en la $[Na^+]_o$ en un modelo *in vitro* de ratas.
- Demostrar la expresión del canal Nax en las MNCs del SON por inmunofluorescencia.
- Comparar los efectos del estímulo hipernatrémico en MNCs identificadas como MNC^{OT} y MNC^{VP} .
- Aislar la corriente del canal Nax en presencia de un estímulo hipernatrémico isoosmótico.
- Aislar la respuesta al alto Na^+ por bloqueo de otros canales permeables a Na^+ (VGSCs, TRPV1 y ENaCs).
- Examinar si el silenciamiento del gen *Scn7A* atenúa la respuesta de las MNCs a un estímulo hipernatrémico isoosmótico en modelos *in vitro* e *in vivo* de ratas.
- Determinar que la regulación a la baja del canal Nax reduce la respuesta de las MNCs en un modelo en ratas de hipernatremia *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Drogas y anticuerpos

Todas las drogas fueron mantenidos en soluciones de reserva. Citrato de tetrodotoxina 10 mM (TTX, en agua; Alomone labs, Jerusalem BioPark, Israel), SB366791 17.3 mM (SB, en DMSO; Sigma-Aldrich, Ontario, Canadá), benzamil 5.6 mM (BZ, en agua; Sigma-Aldrich, Wisconsin, EUA). Anticuerpos de fuentes comerciales: Anti-SCN7A policlonal (bs-12127R) 1:200 (Bioss antibodies, Massachussets, EUA), Anti-Vasopresina (antibody-403004) 1:1000 (SYSY, Goettingen, Alemania), Anti-Oxitocina (clone 4G11) 1:1000 (MilliporeSigma, Ontario, Canadá), Anti-c-FOS monoclonal (226 008) 1:2000 (SYSY, Goettingen, Alemania), Anti-GFAP 1:500 (abcam, Massachussets, EUA).

Animales

Ratas Wistar hembras y machos fueron usados en este estudio. Las ratas fueron mantenidas en un ciclo de luz 12:12 h con acceso a agua y comida *ad libitum*. Todos los procedimientos que involucraron animales fueron llevados a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité de Cuidado de Animales de las instalaciones de la Universidad McGill, y el UPEAL-CINVESTAV de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999. En los experimentos realizados en la Universidad de McGill se utilizaron ratas Wistar transgénicas, hembras y machos (12-24 semanas), que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) y la proteína roja fluorescente (RFP) bajo el control del promotor del gen VP y OT, respectivamente. Los experimentos realizados en el CINVESTAV se realizaron en ratas Wistar macho adultas (5-8 semanas).

Preparación de la rebanada

Rebanadas agudas de 400 μm de grosor del hipotálamo, fueron obtenidas usando el vibratomo VT-1200 (Leica Biosystems Inc, Ontario, Canadá) con un ángulo de 38° relativo a la superficie de la corteza y sumergidas en fluido cerebroespinal artificial (ACSF, 95 % O_2 ; 5 % CO_2 ; 31°C), por al menos una hora antes de comenzar los registros (Stachniak et al, 2012). La composición del ACSF fue la siguiente (en mM): 120 NaCl, 3 KCl, 1.23 NaH_2PO_4 , 1.48 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 26 NaHCO_3 , 10 Glucosa, osmolalidad 295 ± 3 mOsmol/Kg (ver tabla 1).

Registros electrofisiológicos en rebanadas

Registros en fijación de corriente y voltaje fueron obtenidos usando la configuración de célula completa de MNCs identificadas como MNC^{VP} o MNC^{OT} . En todos los experimentos se usó un puente de agar de NaCl (1M) para eliminar las compensaciones de voltajes en el electrodo de tierra. Los registros de fijación de voltaje fueron hechos utilizando un potencial de mantenimiento de -50 mV. Los electrodos de registro se prepararon a partir de tubos capilares de vidrio llenos de una solución que contenía (en mM): 120 Gluconato de K^+ , 10 HEPES, 1 MgCl_2 , 0.1 CaCl_2 , 10 KCl, 1 EGTA- Na_4 , 2 Na_2ATP , 1 NaGTP , 285 ± 3 mOsmol/Kg, pH 7.40. La resistencia de las pipetas en el baño fue de 3-5 $\text{M}\Omega$. Algunos de los registros fueron obtenidos en presencia de TTX $0.5 \mu\text{M}$ (bloqueador de los VGSCs), BZ $2 \mu\text{M}$ (bloqueador de los ENaCs), y/o SB $3 \mu\text{M}$ (bloqueador de los TRPV1). Las señales fueron registradas usando el amplificador 700B multiclamp, digitalizadas por Digidata 1440A (Molecular Devices, LLC, California, EUA) a 10 KHz y filtrado 2 KHz. Los datos electrofisiológicos fueron analizados usando pClamp (Molecular Devices, LLC, California, EUA).

Soluciones

Seguido de 3 min de registro de la actividad basal, los estímulos de Na⁺ en rebanadas se aplicaron en forma de rampas (3 min). Las concentraciones máximas alcanzadas durante estas pruebas fueron + 3, + 4, + 9 y + 15 mM [Na⁺]_o determinadas por análisis de electrolitos (Easy Electrolytes 4102 000, Massachussets, EUA). Estas rampas se lograron mediante la aplicación de soluciones más concentradas (+ 4, + 8, + 15, + 36 mM [Na⁺]_o; 2 mL/min) en una cámara de registro con un volumen estático de 3.5 mL. La solución hipernatrémica isoosmótica + 4 mM contenía (en mM): 110 NaCl, 7 Na₂SO₄, 3 KCl, 1.23 NaH₂PO₄, 1.48 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 Glucosa, 295 ± 3 mOsmol/Kg. La solución hipernatrémica isoosmótica + 8 mM contenía (en mM): 100 NaCl, 14 Na₂SO₄, 3 KCl, 1.23 NaH₂PO₄, 1.48 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 Glucosa, 295 ± 3 mOsmol/Kg. La solución hipernatrémica isoosmótica + 15 mM contenía (en mM): 75 NaCl, 35 Na₂SO₄, 3 KCl, 1.23 NaH₂PO₄, 1.48 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 Glucosa, 298 ± 3 mOsmol/Kg. La solución hipernatrémica isoosmótica + 36 mM contenía (en mM): 78 Na₂SO₄, 3 KCl, 1.23 NaH₂PO₄, 1.48 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 Glucosa, 295 ± 3 mOsmol/Kg (ver tabla 1).

Preparación de células aisladas

Ratas Wistar fueron sacrificadas por decapitación y el cerebro fue rápidamente removido y sumergido en la solución de Locke que contenía (en mM): 110 NaCl, 5 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 1.8 CaCl₂, 10 Glucosa, 26 NaHCO₃, 10 HEPES, 290 ± 5 mOsm/Kg, pH 7.4. El SON fue diseccionado usando tijeras de iridectomía a partir de rebanadas de 1 mm de espesor. El bloque de tejido se colocó en la solución de Locke a la cual se le agregó 1.5 mg/mL de papaína (Sigma-Aldrich), por 30 min a 37 °C. El tejido se transfirió a solución de Locke libre de papaína, se trituró con pipetas Pasteur pulidas al fuego y se centrifugó a 1000 rpm

durante 2 min. El sobrenadante se descartó y el botón de células fue resuspendido en 500 μ L de medio neurobasal-A que contenía suero B37 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Las MNCs fueron sembradas en cámaras de registro con fondo de vidrio cubierto con colágeno tipo 1 (0.01 %; Sigma-Aldrich). Solo las células con un diámetro mayor a 20 μ m fueron registradas.

Electrofisiología en MNCs aisladas

Se realizaron registros en fijación de corriente y voltaje en la configuración de célula completa con un potencial de mantenimiento de -40 mV. Las pipetas de registro se llenaron con solución interna que contenía (en mM): 60 NaCl, 25 CsCl, 2 KCl, 10 HEPES, 5 TEA-Cl, 4 Mg-ATP, 0.02 EGTA-Na, 110 Manitol, 290 ± 5 mOsmol/Kg, pH 7.40. Las resistencias de las pipetas en el baño fueron de 4-8 M Ω . En cada caso un periodo de 20 s de actividad basal fue registrado en una solución externa que contenía (en mM): 60 NaCl, 8.9 CsCl, 2 KCl, 2.4 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 0.5 CdCl₂, 10 HEPES, 10 TEA-Cl, 5 Glucosa, 1 4-AP, 0.0005 TTX, 110 Manitol, 290 ± 5 mOsmol/Kg, pH 7.40. Después, una solución hipernatrémica isoosmótica fue aplicada, con la siguiente composición (en mM): 60 NaCl, 24 Na₃-citrato, 8.9 CsCl, 2 KCl, 2.4 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 10 HEPES, 10 Manitol, 5 Glucosa, 0.5 CdCl₂, 10 TEA-Cl, 1 4-AP, 0.0005 TTX, 290 ± 5 mOsmol/Kg, pH 7.40. Un protocolo de rampas (-80 a 80 mV) fue usado para obtener las curvas I-V antes (control) y 20 s después del alto Na⁺. Las señales se registraron con un amplificador Axopatch 200A, se digitalizaron con DigiData 1200 (Molecular Devices) y se filtraron a 5 KHz. Los datos electrofisiológicos se analizaron utilizando pClamp (Molecular Devices).

Las respuestas del voltaje y corriente a estímulos más pequeños ($+ 36$ mM) fueron también registradas en células aisladas. En cada caso, un periodo de 20 s de actividad basal fue registrado en una solución externa compuesta (en mM): 136 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 290 ± 5 mOsmol/Kg, pH 7.40. Después, una solución hipernatrémica isoosmótica ($+ 36$ mM) fue aplicada, la cual contenía (en mM): 46 Na₃-citrato, 34 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 20 Manitol

290 ± 5 mOsmol/Kg, pH 7.40. La solución interna estaba compuesta (en mM): 130 KCl, 10 NaCl, 2 MgCl₂, 0.02 EGTA, 10 HEPES, 290 ± 5 mOsmol/Kg, pH 7.40.

Inmunohistoquímica

Las ratas utilizadas en este apartado fueron profundamente anestesiadas con 5 % de isoflurano y sacrificadas por una perfusión transcardiaca con 4 % de paraformaldehído (PFA; Sigma-Aldrich). Secciones coronales del SON (50 µm de grosor) fueron obtenidas usando un vibratomo VT-1200. Las secciones fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente en una solución de bloqueo de PBS que contenía 2 % de suero normal de cabra (NGS; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) y 0.25 % de triton X-100 (Sigma-Aldrich). Luego fueron incubadas toda la noche a 4 °C usando varios anticuerpos primarios (mencionados arriba). Las secciones fueron lavadas en PBS-0.25 % Triton X-100 y luego incubadas por 2 h a temperatura ambiente en PBS que contenía Alexa fluor-647 anti-rabbit (1:500), Alexa fluor-488 anti-guinea pig (1:500), Alexa fluor-405 anti-mouse (1:500) y Alexa fluor-568 anti-chicken (1:500; todos de Invitrogen). Todas las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio confocal laser de barrido FV3000 (Olympus Canadá), y el análisis se realizó usando ImageJ (NIH).

Silenciamiento del canal Na_x medido por AAV en las MNCs del SON

Se utilizaron tres virus adenoasociados (AVVs) para inducir el silenciamiento del canal Na_x (Vector Builds, Chicago, EUA). Las secuencias dirigidas contra el gen *Scn7A* de rata fueron: shRNA_{NaX1} TAAGCAGGGAGGATCAAATAT, 1.66 x 10¹³ GC/mL, shRNA_{NaX2} GTAACACATCGTGTCTTTAAT, 1.51 x 10¹³ GC/mL y shRNA_{NaX3} TGGCTCTGGAAGACATATATA 2.5 x 10¹³ GC/mL. La expresión es controlada por el promotor U6, que también indujo la expresión del reportero mCherry. Para inducir el silenciamiento del canal Na_x en el SON, ratas macho

Wistar GFP (12 semanas) fueron anestesiadas con isoflurano al 5 % y estereotáxicamente inyectadas con 1 μ L de AAVs (una mezcla de los tres shRNA_{NaX}(123) o con el scramble; scRNA) en las siguientes coordenadas: Bregma -1.1; ML \pm 1.8; DP -8.7 mm. Durante las cirugías las ratas fueron mantenidas anestesiadas con 2.5 % de isoflurano y mantenidas a 37 °C con un controlador de la temperatura (TCAT 2LV Physitemp Instrument INC, Clifton New Jersey). Tres semanas después de la inyección, registros de célula completa en rebanadas fueron obtenidos en presencia de TTX 0.5 μ M, BZ 2 μ M y SB 3 μ M. La eficacia del silenciamiento se cuantificó comparando la intensidad de la señal anti-NaX en las células infectadas (en relación con las células no infectadas) en el SON inyectado con AAV que inducen la expresión del shRNA_{NaX} o del scRNA. Para el análisis, se excluyeron las células que mostraron intensidades superiores o inferiores al doble de la desviación estándar de la media.

Análisis de c-fos

Ratas Wistar fueron inyectadas estereotáxicamente en ambos SON con los AAVs (shRNA_{NaX} en el SON derecho y scRNA en el SON izquierdo). Después de tres semanas, estas ratas fueron inyectadas con una solución 2M de NaCl (subcutáneamente; 1.43 mL/Kg) o con una solución 3M de sacarosa (intraperitoneal; 1.91 mL/Kg). Una hora más tarde, las ratas fueron anestesiadas con isoflurano 5 % y perfundidas con PFA. Secciones coronales del SON (50 μ m de grosor) fueron cortadas usando un vibratomo VT1200. Las secciones fueron bloqueadas con PBS-0.3 % Triton X-100 y 10 % de NGS, por una hora a temperatura ambiente. Después de lavar la solución de bloqueo, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios anti-c-Fos (1:2000) y anti-VP (1:1000) durante 24 h a 4 °C. Las secciones fueron lavadas con PBS-0.3 % Triton X-100 y luego incubadas por 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios Alexa fluor-405 anti-rabbit (1:500) y Alexa fluor-488 anti-guinea pig (1:500). Todas las imágenes fueron adquiridas usando un microscopio confocal

laser de barrido FV3000 (Olympus Canadá), y el análisis se realizó usando ImageJ (NIH). Solo las células que fueron claramente positivas a c-fos fueron utilizadas para determinar el porcentaje de MNCs infectadas y que expresan c-fos por cada animal.

Análisis estadístico

Todos los valores en este estudio están reportados como el promedio más o menos el error estándar del mismo (promedio \pm SEM). Las diferencias entre grupos fueron presentadas usando Sigmaplot 12.3 (Systat Software Inc. California, EUA). El software primero evalúa la normalidad de la distribución de datos y la varianza entre grupos. Cuando estas condiciones no se cumplieron, se realizó una prueba no paramétrica adecuada. Todas las pruebas usadas para las comparaciones son especificadas en el texto. Las gráficas presentadas fueron preparadas usando Prism 5.0 (GraphPad Software, Massachusetts, EUA), el cual también se utilizó para calcular y graficar las regresiones lineales. En todas las comparaciones estadísticas, las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Las MNC^{OT} y MNC^{VP} de hembras y machos responden igualmente al estímulo hipernatrémico-isoosmótico

Para determinar si las MNC^{OT} y las MNC^{VP} de hembras y machos pueden responder al incremento en la $[Na^+]_o$, en ausencia de un incremento en la osmolalidad, se realizaron experimentos en rebanadas agudas hipotalámicas obtenidas de ratas adultas doble transgénicas. Estas ratas expresan la GFP y la RFP en las MNC^{VP} y las MNC^{OT}, respectivamente (Ueta et al., 2005; Ueta et al., 2008; Katoh et al., 2011) (Figura 10A-B). Como se ilustra en la Figura 10C-D, los registros en fijación de voltaje en la configuración de célula completa ($V_h = -50$ mV), mostraron que la aplicación de un incremento en forma de rampa de la $[Na^+]_o$ (ver tabla 1), evocó una corriente entrante en ambos tipos de neuronas de hembras y machos. El promedio máximo de la corriente de entrada fue estadísticamente significativo en todos los casos (hembras MNC^{OT} – 25.66 ± 2.18 pA, $n = 10$ de 4 ratas, $p = 9.1 \times 10^{-7}$; hembra MNC^{VP} – 23.11 ± 2.42 pA, $n = 13$ de 6 ratas, $p = 5.9 \times 10^{-7}$; macho MNC^{OT} – 22.88 ± 2.31 pA, $n = 14$ de 7 ratas, $p = 2.1 \times 10^{-7}$; macho MNC^{VP} – 25.26 ± 3.79 pA, $n = 12$ de 5 ratas $p = 3.5 \times 10^{-5}$, prueba de t pareada), pero no fueron estadísticamente diferentes entre grupos (ANOVA de una vía, $F = 0.2634$, $p = 0.8514$, Figura 10E).

	control	+4	+8	+15	+36
NaCl	120	110	100	75	0
KCl	3	3	3	3	3
NaH ₂ PO ₄	1.23	1.23	1.23	1.23	1.23
MgCl ₂	1.48	1.48	1.48	1.48	1.48
CaCl ₂	2	2	2	2	2
NaHCO ₃	25.95	25.95	25.95	25.95	25.95
Glucosa	10	10	10	10	10
Na ₂ SO ₄	0	7	14	35	78
Osm (mOsm)	295±3	295±3	295±3	298±3	295±3
[Na ⁺] Teórica	147.18	151.18	155.18	172.18	183.18
[Na ⁺] Medida	148	151	152	157	163

Tabla 1. **Composición de las soluciones usadas en rebanadas**

Similarmente, los registros en fijación de corriente mostraron que las MNC^{OT} y las MNC^{VP} de hembras y machos fueron gradualmente despolarizadas y excitadas por el mismo estímulo (Figura 10C-D). El promedio de la despolarización máxima inducida por el alto Na⁺ fue estadísticamente significativamente (hembra MNC^{OT} 3.8 ± 0.6 mV, n = 10 de 4 ratas, p = 7.2x10⁻⁵; hembra MNC^{VP} 4.9 ± 1.1 mV, n = 11 de 7 ratas, p = 1.6x10⁻³; macho MNC^{OT} 5.1 ± 1.1 mV, n = 7 de 4 ratas, p = 3.9x10⁻³; macho MNC^{VP} 4.2 ± 0.7 mV, n = 13 de 7 ratas, p = 6.3x10⁻⁵; prueba de t pareada), pero no fue estadísticamente diferente entre grupos (ANOVA de una vía, F = 0.3945, p = 0.7577, Figura 10F). De acuerdo con estos resultados, el promedio máximo de la frecuencia de disparo de los potenciales de acción evocada por el estímulo hipernatrémico isoosmótico, fue estadísticamente diferente (hembra MNC^{OT} 8.26 ± 1.16 Hz, n = 6 de 4 ratas, p = 8.4x10⁻⁴; hembra MNC^{VP} 7.55 ± 1.67 Hz, n = 10 de 6

ratas, $p = 1.4 \times 10^{-3}$; macho MNC^{OT} 7.12 ± 1.57 Hz, $n = 7$ de 4 ratas, $p = 3.9 \times 10^{-3}$; macho MNC^{VP} 12.26 ± 2.35 Hz, $n = 12$ de 7 ratas, $p = 2.8 \times 10^{-4}$; prueba de t pareada), pero no se encontró una diferencia significativa entre grupos (ANOVA de una vía, $F = 1.613$, $p = 0.2063$, Figura 10G). Finalmente, los valores de la corriente medidos en función de la $[Na^+]_o$ presentaron una buena correlación, permitiendo que la sensibilidad a Na^+ para cada neurona fuera cuantificada como la pendiente de una regresión linear. Como se muestra en la Figura 10H, la sensibilidad a Na^+ de las MNC^{OT} fue equivalente a la de las MNC^{VP} . Asimismo, no se encontró una diferencia significativa entre hembras y machos (ANOVA de una vía, $F = 1.485$, $p = 0.231$).

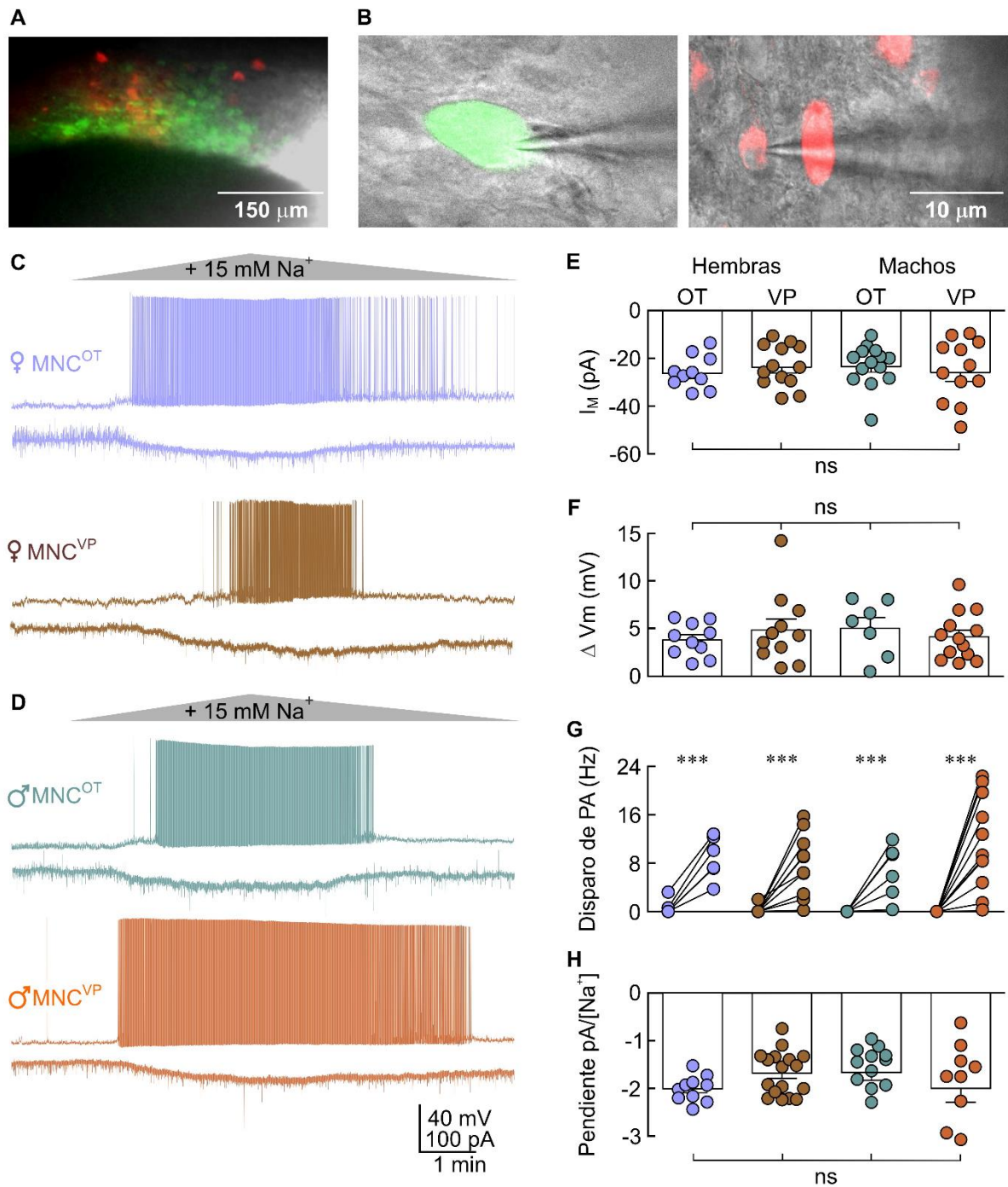


Figura 10 | Efectos del aumento en la $[Na^+]_o$ sobre las MNC^{OT} y las MNC^{VP} de ratas hembra y macho. A) Fotografía de bajo aumento (10X) del SON en un corte hipotalámico horizontal de una rata transgénica que expresa GFP en las MNC^{VP} y RFP en las MNC^{OT} . La estructura oscura inferior de la imagen es el tracto óptico. B) Fotografía de alto aumento (60X) de una MNC^{VP} (izquierda) y una MNC^{OT} (derecha), ambas con electrodos de registro. C) Efectos del aumento de la $[Na^+]_o$, mientras se mantiene una osmolalidad constante (rampa gris, ver Materiales y métodos), en una MNC^{OT} (lila) y una MNC^{VP} (marrón) en cortes de ratas hembra.

Los trazos superiores muestran los registros en fijación de corriente, mientras que los trazos de abajo muestran los registros en fijación de voltaje ($V_h = -50$ mV), ambos en presencia del estímulo hipernatrémico isoosmótico. D) Efectos del aumento de la $[Na^+]_o$ en una MNC^{OT} (verde) y una MNC^{VP} (naranja) en cortes de ratas macho (como en C). Para cuantificar los trazos, se compararon los valores observados al final del estímulo con los valores de referencia antes del inicio del estímulo. E) La gráfica muestra el promedio \pm SEM, de la amplitud de la corriente de membrana (I_m) inducida por el cambio de la $[Na^+]_o$, de todas las condiciones (cada círculo son datos de una célula diferente; ns, no significativo). F) La gráfica muestra el promedio \pm SEM, del cambio en el potencial de membrana inducido por Na^+ (ΔV_m), de todas las condiciones (cada círculo son datos de una célula diferente; ns, no significativo). G) La gráfica de dos puntos muestra los cambios en la frecuencia de disparo de potenciales de acción (PA) inducidos por el estímulo alto en Na^+ , en todas las condiciones. Cada línea une la frecuencia de disparo en condiciones control (izquierda) y estimuladas con alto Na^+ (derecha) de células individuales. *** indica $p < 0.001$. H) La gráfica muestra el promedio \pm SEM de la sensibilidad a Na^+ , de todos los subtipos de MNCs, expresada como la pendiente de una regresión lineal ajustada a través de los datos graficados en E (I_m) en función de la $[Na^+]_o$ para cada célula (ns, no significativo; ANOVA de una vía).

La magnitud de la respuesta al estímulo hipernatrémico isoosmótico depende de la $[Na^+]_o$

Para confirmar el grado de sensibilidad observado durante las rampas que alcanzan un máximo de 15 mM, se examinaron los efectos de rampas que alcanzan concentraciones más bajas (ver tabla 1). Como se muestra en la Figura 11A-B, las MNC^{VP} de ratas macho expuestas a estas rampas de Na^+ (entre +3 y +15 mM) mostraron un cambio en la corriente de entrada máxima, estadísticamente significativo y dependiente de la dosis, con todos los estímulos (+3 mM, -1.07 ± 0.30 pA, $n = 7$ de 5 ratas, $p = 0.0113$; +4 mM, -2.02 ± 0.63 pA, $n = 8$ de 5 ratas, $p = 0.008$; +9 mM, -6.37 ± 1.29 pA, $n = 8$ de 4 ratas, $p = 0.008$; prueba de t pareada; Figura 11C). Además, hubo una relación lineal entre la amplitud máxima de la corriente de membrana y el tamaño máximo del estímulo de Na^+ . Es de importancia mencionar, que la sensibilidad al Na^+ evaluada de esta manera (pendiente -1.86 pA/mM, $r^2 = 0.72$, diferente de cero $p < 0.0001$) fue equivalente a la observada de los análisis en la Figura 10H. Asimismo, las diferentes $[Na^+]_o$ alcanzadas con las rampas, causaron cambios significativos y proporcionales en el potencial de

membrana de las MNCs (+3 mM, 0.78 ± 0.13 mV, $n = 11$ de 7 ratas, $p = 1.1 \times 10^{-4}$; +4 mM, 1.31 ± 0.18 mV, $n = 18$ de 8 ratas, $p = 1.6 \times 10^{-6}$; +9 mM, 1.73 ± 0.23 mV, $n = 12$ de 5 ratas, $p = 1.3 \times 10^{-5}$; prueba de t pareada; Figura 11D). También hubo una relación lineal entre el cambio máximo en el potencial de membrana y $[Na^+]_o$ máxima de la rampa (pendiente 0.26 mV/mM, $r^2 = 0.65$, diferente de cero $p < 0.0001$). Finalmente, los incrementos máximos de la $[Na^+]_o$ alcanzados con las rampas provocaron un aumento proporcional en la frecuencia de potenciales de acción (pendiente 0.59 Hz/mM, $r^2 = 0.59$, diferente de cero $p < 0.0001$; Figura 11E).

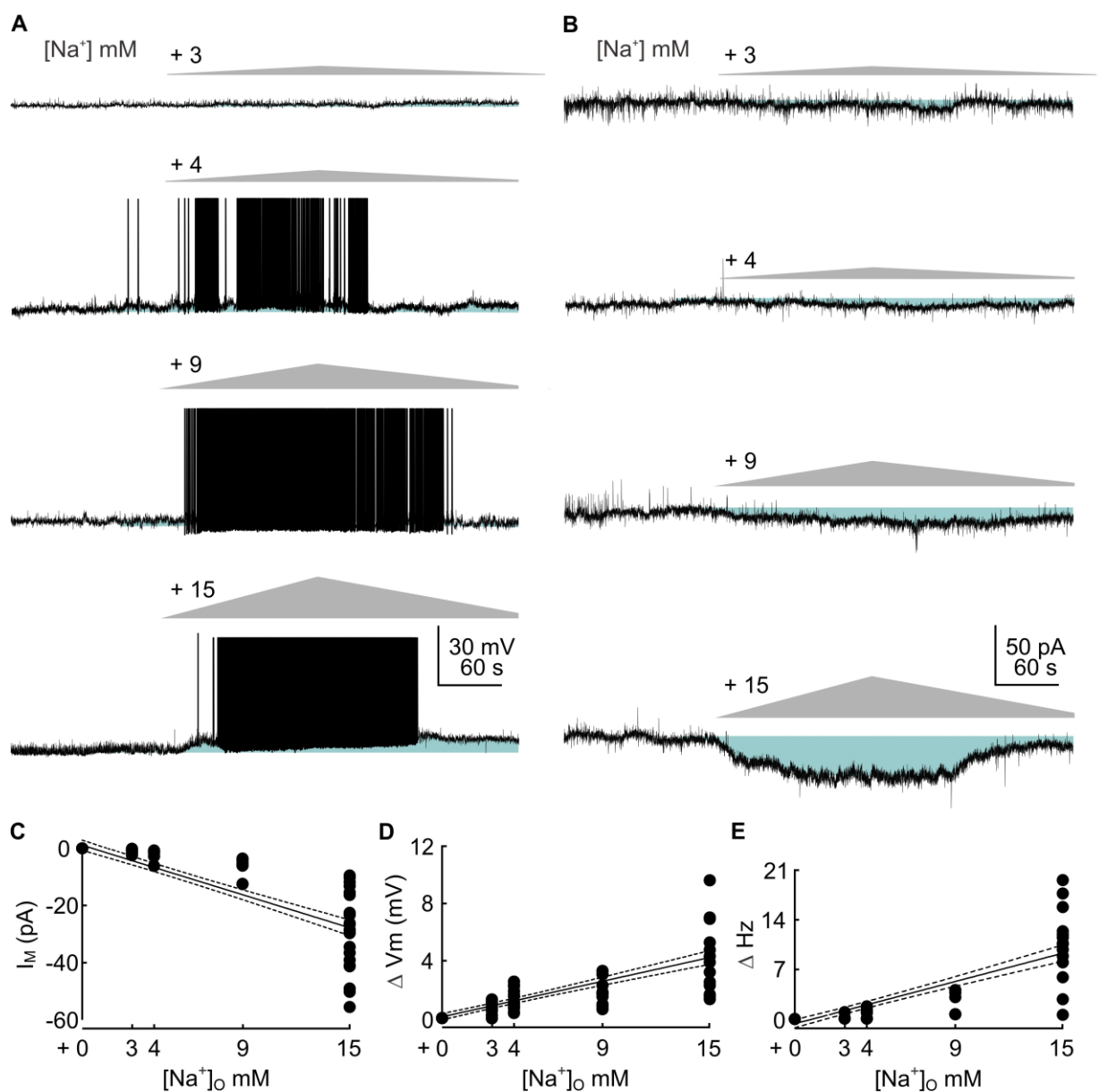


Figura 11 | **Las MNCs responden a los cambios fisiológicos de la $[Na^+]_o$.** A) Los registros en fijación de corriente de las MNC^{VP} en cortes hipotalámicos agudos muestran los efectos de las rampas de la $[Na^+]_o$ (gris) con cuatro amplitudes máximas diferentes (indicadas a la izquierda de la rampa). B) Los registros en fijación de voltaje de MNC^{VP} muestran los efectos de los mismos estímulos en la corriente de membrana ($V_h -50$ mV). C) La gráfica muestra los cambios en el potencial de membrana (ΔV_m) inducidos por diferentes estímulos de $[Na^+]_o$. Cada punto muestra datos de una célula diferente, la línea continua es un ajuste de regresión lineal y la línea discontinua muestra un intervalo de confianza del 95 %. D) La gráfica muestra los cambios en la corriente de membrana (I_M) inducidos por los diferentes estímulos $[Na^+]_o$. Cada punto muestra datos de una célula diferente, la línea continua es un ajuste de regresión lineal y la línea discontinua muestra un intervalo de confianza del 95 %. E) La gráfica muestra los cambios en la frecuencia de disparo (Δ Hz) inducidos por los diferentes estímulos de la $[Na^+]_o$. Cada punto muestra datos de una célula diferente, la línea continua es un ajuste de regresión lineal y la línea discontinua muestra un intervalo de confianza del 95 %.

El canal Nax está expresado en las MNC^{OT} y las MNC^{VP} , pero no se encuentra expresado en astrocitos

Se examinó la expresión del canal Nax en el SON mediante inmunohistoquímica con anticuerpos dirigidos a VP, OT, GFAP (proteína ácida fibrilar glial), así como un anticuerpo policlonal anti-Scn7A que se dirige a un epítipo en la porción distal del carboxilo-terminal citoplasmático del canal Nax . No se observó señal cuando se aplicaron anticuerpos secundarios a secciones no tratadas con estos anticuerpos primarios (Figura 12A-B). Como se muestra en la Figura 12C-D, el canal Nax se expresó fuertemente en todo el SON y colocalizó tanto con OT como con VP. Para determinar si Nax también se expresa en astrocitos, se tiñó el SON usando un anticuerpo dirigido contra GFAP. A diferencia de los somas de MNC, se encontró que Nax no colocalizó con GFAP (Figura 12E-F). Estos resultados sugieren que el canal Nax puede mediar la respuesta a Na^+ tanto en MNC^{OT} como en MNC^{VP} , y esta propiedad no requiere de la presencia de los canales Nax en astrocitos.

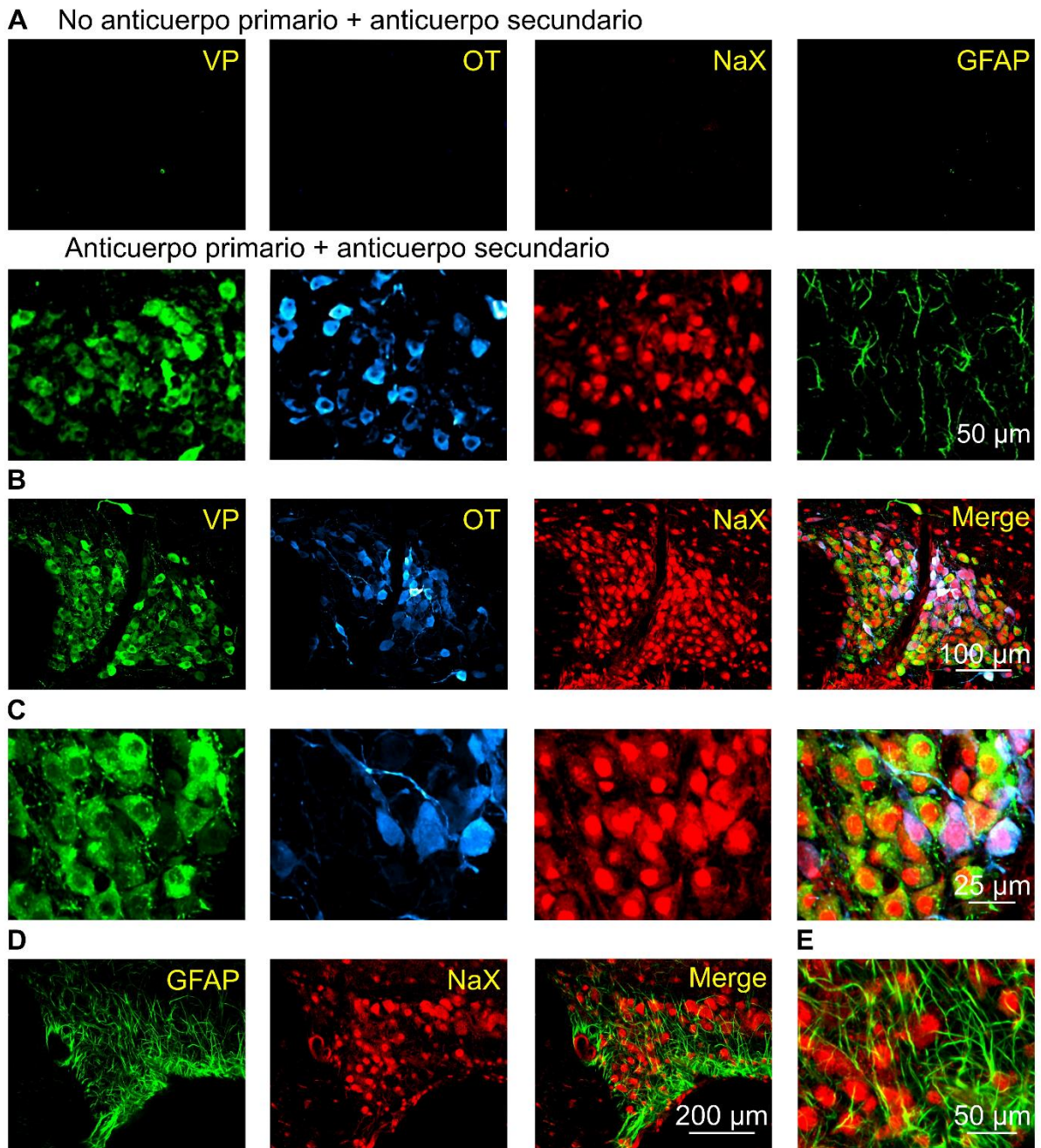


Figura 12 | **El canal Na_x se expresa en ambas MNCs, pero no se expresa en los astrocitos del SON de rata.** A) Las imágenes confocal muestran que las señales detectadas (paneles inferiores) estaban ausentes cuando se tiñeron en ausencia de anticuerpo primario (paneles superiores). B) Las imágenes confocales muestran la expresión de VP (verde), OT (azul), Na_x (rojo) y el empalme (derecha) en una sección representativa del SON. C) Imágenes confocal con mayor aumento, diseño como en B. D) Las imágenes confocales muestran la expresión de GFAP (verde), Na_x (rojo) y el empalme de estas. E) Imagen confocal de mayor aumento de la imagen empalmada en D.

Las MNCs aisladas responden al estímulo hipernatrémico isoosmótico

Para determinar si estas neuronas intrínsecamente sensibles al aumento en la $[Na^+]_o$, se probó el efecto del estímulo hipernatrémico isoosmótico en las MNCs agudamente aisladas del SON (Figura 13A). Como se ilustra en la Figura 13B, el incremento de la $[Na^+]_o$ por + 36 mM causó una corriente de entrada reversible en condiciones de fijación de voltaje, que correlaciona con una despolarización de la membrana, y con un incremento en el disparo de potenciales de acción, en condiciones de fijación de corriente. Los efectos del aumento de la $[Na^+]_o$ en la corriente de membrana ($n = 4$ de 3 ratas, Figura 13C) y el potencial de membrana ($n = 4$ de 3 ratas, Figura 13D) fueron estadísticamente significativos ($p = 0.0156$ y $p = 0.0099$, respectivamente; prueba t pareada). Para determinar si esta corriente de entrada está mediada por la entrada de Na^+ , se obtuvieron relaciones corriente-voltaje en ausencia y presencia de alto Na^+ . Como se muestra en la Figura 13E, la estimulación con Na^+ provocó un aumento significativo en la conductancia (de 0.39 ± 0.07 nS a 0.83 ± 0.10 nS; $p = 0.003$; prueba t pareada). Además, el potencial de inversión (E_{Rev} , de 17.5 ± 2.5 mV, $n = 9$ de 4 ratas; Figura 13F), fue equivalente al potencial de inversión de Na^+ (E_{Na}) bajo nuestras condiciones (19.9 mV; $p = 0.3534$, prueba t). Todos estos resultados indican que las MNCs responden al aumento en la $[Na^+]_o$ mediante la activación de canales iónicos selectivos de Na^+ .

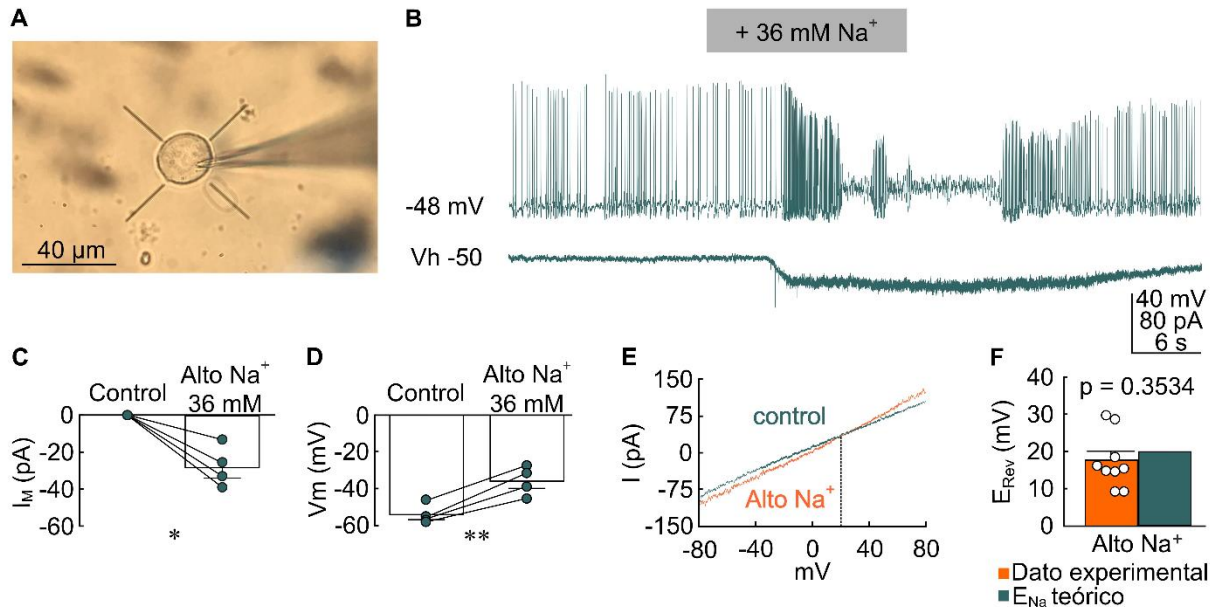


Figura 13 | **Efectos del alto Na⁺ en MNCs aisladas.** A) Imagen de una MNC aislada y con electrodo de registro. B) Los trazos muestran los efectos del alto Na⁺ sobre el voltaje (superior, potencial de membrana indicado a la izquierda) y la corriente (inferior, V_h mostrado a la izquierda) en la misma célula. C) La gráfica muestra el promedio ± SEM (I_m) de la corriente de membrana antes (control) y en presencia de alto Na⁺. Cada línea une los puntos de datos de una célula diferente. * p = 0.0156; prueba t pareada. D) La gráfica muestra el promedio ± SEM del potencial de membrana (V_m) antes (control) y en presencia de alto Na⁺. Cada línea une los puntos de datos de una célula diferente. ** p = 0.0099; prueba t pareada. E) Curva I/V (V_h -40 mV; rampa de -80 a +80 mV, 1,5 s) de una MNC en ausencia (control, verde azulado) y presencia de Na⁺ alto (naranja). La línea punteada muestra E_{Na}. F) La gráfica muestra el promedio ± SEM del potencial de inversión (E_{Rev}, barra naranja) de la corriente inducida por alto Na⁺. La barra verde azulado muestra el E_{Na} teórico en estas condiciones.

El canal Na_x media la detección de Na⁺ en MNCs *in vitro*

Para determinar si otros canales, distintos de Na_x, contribuyen a la corriente activada por Na⁺, se examinaron los efectos de los bloqueadores de los VGSCs (tetrodotoxina, TTX, [0.5 μM], n = 10; 4 ratas), Trpv1 (SB366791, [3 μM], n = 11; 4 ratas) y ENaCs (benzamil, BZ, [2 μM], n = 9; 5 ratas). Los bloqueadores no tuvieron un efecto significativo sobre la amplitud de la corriente de entrada máxima inducida

por la rampa de +15 mM Na⁺ en comparación con el control (n = 10, p = 0.481, H = 2.468, prueba de Kruskal-Wallis; Figura 14A-B). Estos resultados indican que los canales Na_x pueden ser el mecanismo principal por el cual se detectan cambios en la [Na⁺]_o en las MNCs.

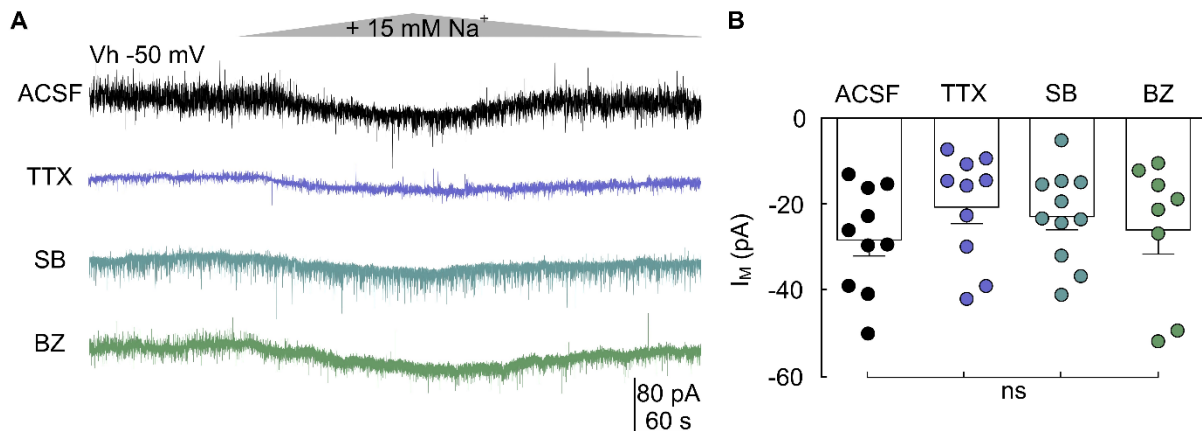


Figura 14 | **La corriente inducida por alto Na⁺ no se afecta por el bloqueo de los VGSCs, Trpv1 o ENaCs.** A) Registros en fijación de voltaje (V_h -50 mV) muestran que la corriente de entrada inducida por alto Na⁺ no se bloquea por la presencia de TTX (0.5 μM; trazo morado), SB366791 (3 μM; trazo azul) y benzamil (BZ, 2 μM; trazo verde). B) La gráfica muestra el promedio ± SEM de las amplitudes máximas de la corriente de entrada (I_M) registrada en ausencia (ACSF) o en presencia de diferentes bloqueadores. Cada punto es la respuesta de una célula (ns, no significativo; ANOVA de una vía).

Debido a que no existe un bloqueador selectivo de los canales Na_x, se utilizaron vectores virales para reducir selectivamente la expresión de estos canales *in vivo* antes de probar su actividad *in vitro*. Los AAVs inducen la expresión de un RNA de horquilla corta anti-Scn7a (shRNA_{Na_x}), o un control (scRNA). Como se muestra en la Figura 15A, los AAVs fueron inyectados estereotáxicamente y por separado en cada SON. Ambos constructos, también inducen la expresión de la proteína mCherry como reportero (Figura 15B), permitiendo la identificación de las células infectadas en rebanadas de cerebro agudas preparadas 3 semanas después de la inyección de los AAVs (Figura 15C). La cuantificación de la inmunofluorescencia anti-Na_x reveló que la infección por AAV redujo la expresión de Na_x en ambos grupos. Sin embargo, la expresión de Na_x fue un 36 % menor en

el grupo shRNA_{NaX} comparado con el scRNA ($p = 0.001$, prueba de t, U de Mann-Whitney; Figura 15F-G). Para aislar, tanto como fue posible, la corriente inducida por los canales Na_X, estos experimentos se realizaron en presencia de TTX, SB366971 y Benzamil (en las concentraciones señaladas anteriormente). Como se ilustra en la Figura 15D-E, la corriente máxima inducida por una rampa de Na⁺ +15 mM fue significativamente menor en las células infectadas con shRNA_{NaX} (-4.30 ± 1.92 pA, $n = 12$ de 3 ratas), comparadas con las células infectadas con el scRNA (-18.38 ± 2.70 pA, $n = 13$ de 4 ratas), células no infectadas adyacentes (-27.24 ± 5.16 pA, $n = 4$ de 3 ratas) y con las MNC^{VP} controles de rebanadas obtenidas de animales no inyectados (-28.36 ± 3.84 pA, $n = 10$ de 6 ratas; $p < 0.001$, $H = 21.113$, prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparación múltiple de Dunn). Estos resultados apoyan fuertemente la noción de que los canales Na_X son responsables de la detección de los incrementos en la $[Na^+]_o$.

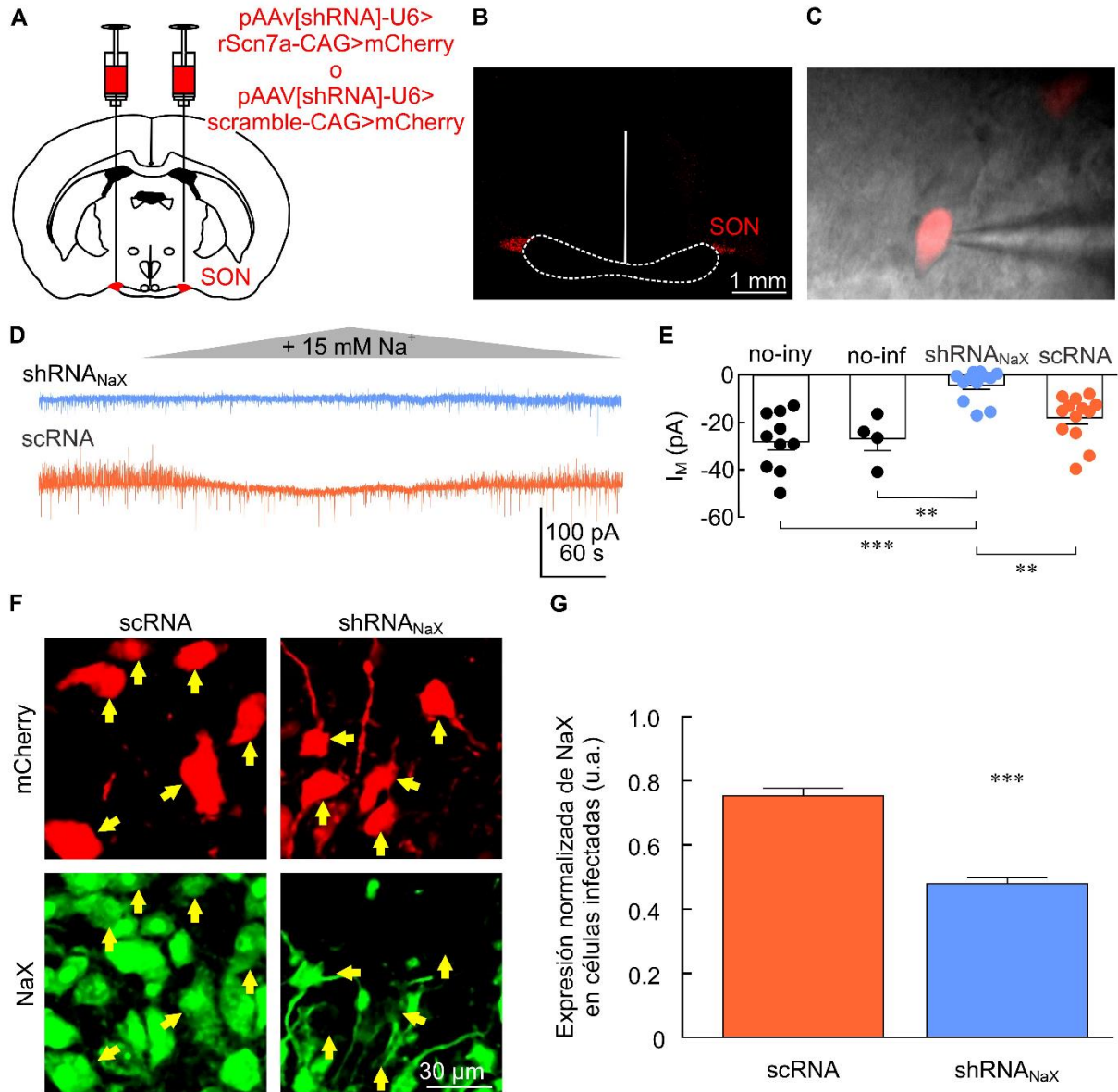


Figura 15 | La reducción de la expresión del *Scn7a* desmejora la respuesta de la corriente entrante al incremento en la $[Na^+]_o$. A) Los AAVs que permiten la expresión de shRNA_{NaX} o scRNA (y mCherry como reportero) se inyectaron en el SON bilateralmente (1 μ l). B) Tres semanas más tarde, se prepararon rebanadas de cerebro agudas para electrofisiología. La expresión de mCherry impulsada por AAV fue visible (la línea discontinua representa el quiasma óptico). C) Los registros electrofisiológicos se obtuvieron de células que expresan mCherry. D) Los trazos muestran ejemplos de la corriente de membrana (V_h -50 mV) en respuesta al incremento en la $[Na^+]_o$, registrados de células infectadas con el shRNA_{NaX} (azul) y el scRNA (naranja). E) La gráfica muestra el promedio \pm SEM de las amplitudes máximas de la corriente de membrana (I_M) de las células de animales no inyectados (no-iny), células no infectadas (no-inf) y células infectadas con el shRNA_{NaX} y el scRNA. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; ANOVA de una vía. F) Las imágenes confocales muestran a las células infectadas que expresan mCherry (arriba, flechas amarillas)

y la correspondiente inmunorreactividad contra Na_x (abajo) de los SON inyectados con el scRNA y el shRNA $_{\text{Na}_x}$. G) La gráfica muestra los valores promedio \pm SEM de la intensidad de la señal anti- Na_x de las células infectadas, calculados como una relación de la intensidad dividida por el promedio de la intensidad de las células no infectadas en la misma sección. *** $p < 0.001$; prueba de t, U de Mann-Whitney.

La expresión del canal Na_x contribuye en la detección de la hipernatremia, pero no en la detección de la hipertonicidad *in vivo*

Los datos reportados anteriormente indican que los canales Na_x permiten que las MNCs detecten aumentos en $[\text{Na}^+]_o$ independientemente de los cambios osmóticos *in vitro*. Para determinar si los canales Na_x contribuyen a la detección de Na^+ pero no a la detección osmótica *in vivo*, se comparó el grado de inducción de c-fos causado por la inyección de NaCl 2 M (s.c. 1.43 mL/Kg) o sacarosa 3 M (i.p. 1.91 mL/Kg), en las MNCs que expresan el shRNA $_{\text{Na}_x}$ o el scRNA (Figura 16A). En estos experimentos, a cada animal se le inyectó el shRNA $_{\text{Na}_x}$ en un SON y el scRNA en el otro SON. Tres semanas después de este procedimiento, se inyectó a las ratas con NaCl 2 M o sacarosa 3 M y se perfundió con paraformaldehído 60 minutos más tarde. La inyección de NaCl 2 M provocó un aumento significativo tanto en la $[\text{Na}^+]_s$ sérica ($p = 0.006$, prueba de t, U de Mann-Whitney) como en la osmolalidad ($p = 0.025$, prueba de t) mientras que la inyección de sacarosa 3 M provocó un aumento equivalente en la osmolalidad ($p = 0.019$, prueba de t, U de Mann-Whitney) sin afectar la $[\text{Na}^+]_s$ sérica ($p = 0.715$, prueba t; Figura 16B-C). Sorprendentemente, la proporción de MNCs infectadas y que expresan c-fos después de la inyección de sacarosa 3 M no se vio afectada por el silenciamiento de Na_x (shRNA $_{\text{Na}_x}$ 20.07 ± 1.66 % $n = 7$ y scRNA 19.99 ± 1.74 % $n = 3$; $p = 0.489$, prueba t; Figura 16D-E). Sin embargo, la reducción de la expresión del canal Na_x redujo significativamente la proporción de las MNCs infectadas y que expresaron c-fos después de la inyección de NaCl 2 M (shRNA $_{\text{Na}_x}$ 9.95 ± 0.66 %, $n = 6$ y scRNA 20.72 ± 2.94 %, $n = 4$; $p = 0.002$, prueba t; Figura 16F-G). En conjunto, estos resultados confirman que el canal Na_x contribuye a la detección de Na^+ *in vivo*, pero no a la osmosensibilidad por parte de las MNCs.

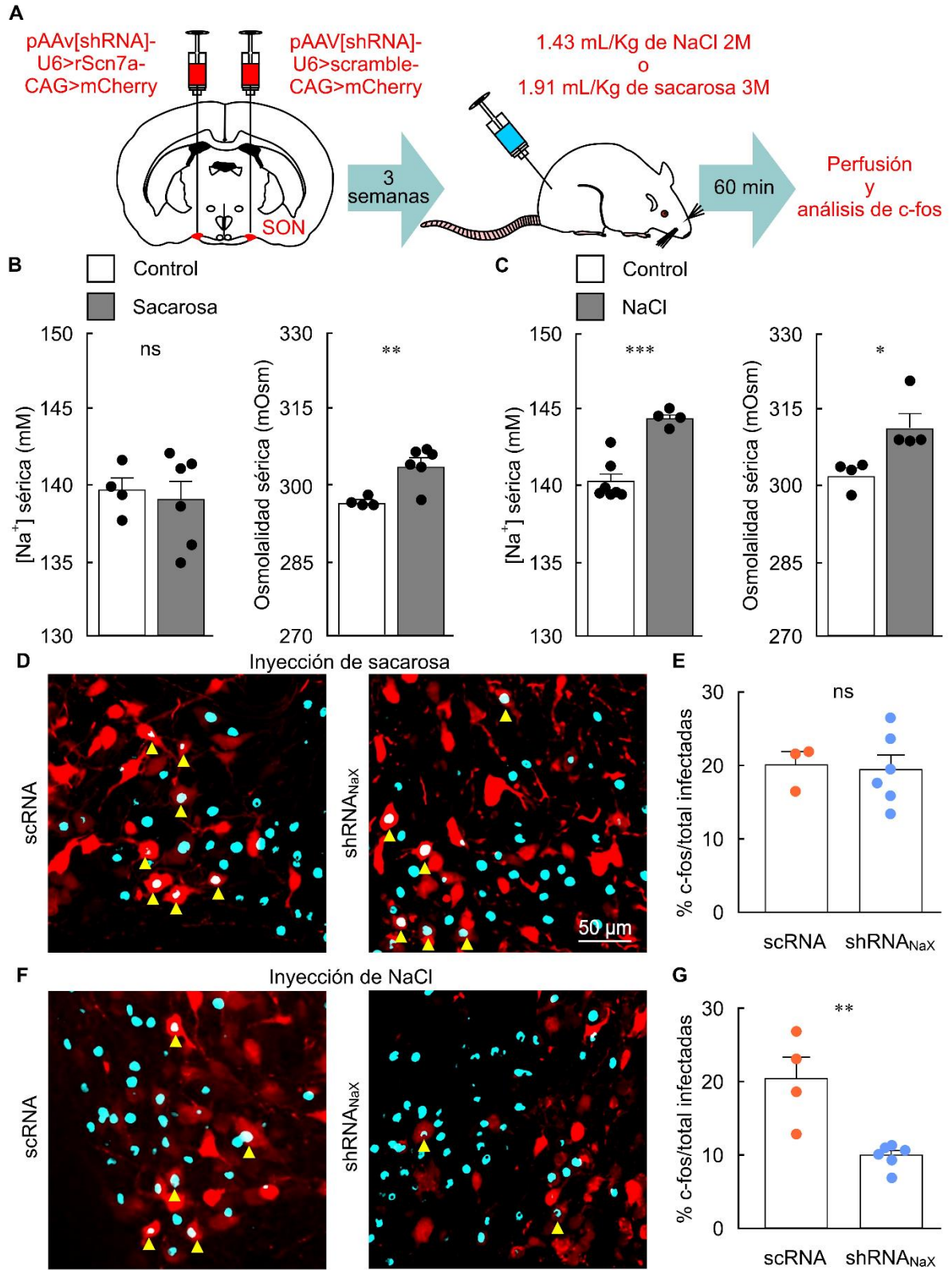


Figura 16 | El silenciamiento de *Scn7a* en las MNCs afecta la respuesta a los niveles elevados de Na^+ sistémicos *in vivo*. A) Los AAVs que permiten la expresión de shRNA_{NaX} y scRNA (y mCherry como reportero) fueron inyectados en los SONs derecho e izquierdo de cada animal, respectivamente (1 μL). Tres semanas más tarde, los animales se sometieron a estimulación hipernatrémica (s.c. NaCl 2M) o hipertónica (i.p. sacarosa 3M) sistémica y se prepararon para análisis de c-fos. B) La gráfica muestra el promedio \pm SEM de los valores de la $[\text{Na}^+]$ (izquierda) y osmolalidad (derecha) sérica, observada 20 min después de la inyección i.p. de sacarosa (3M). ns no significativo, ** $p < 0.01$; prueba de t. C) La gráfica muestra el promedio \pm SEM de los valores de la $[\text{Na}^+]$ (izquierda) y osmolalidad (derecha) sérica, observada 20 min después de la inyección s.c. de NaCl (2M). * $p < 0.1$ *** $p < 0.001$; prueba de t. D) Las imágenes confocal muestran que la inyección con sacarosa fue igualmente eficaz para inducir la expresión de c-fos en las células infectadas con el scRNA o el shRNA_{NaX}. Las flechas amarillas muestran células infectadas (en rojo) y que expresan c-fos (en cian). E) La gráfica muestra el promedio \pm SEM de la fracción de las células infectadas y que expresan c-fos entre el total de las MNCs infectadas con el scRNA o con el shRNA_{NaX}, de ratas con estimulación hipertónica. ns no significativo. F) Los paneles muestran que la inyección con NaCl fue menos efectiva para inducir la expresión de c-fos (en cian) en células infectadas (en rojo) con shRNA_{NaX}. G) La gráfica muestra el promedio \pm SEM de la fracción de las células infectadas y que expresan c-fos, entre el total de las MNCs infectadas con el scRNA o con el shRNA_{NaX}, en ratas con estimulación hipernatrémica. ** $p < 0.01$; ANOVA de una vía.

DISCUSIÓN

Las combinaciones de estudios anatómicos, quimio/optogenéticos, de lesiones y genéticos han establecido que tanto los osmorreceptores como los detectores de Na^+ ubicados en el SFO y el OVLT median la dinámica de las respuestas osmorreguladoras (Denton et al., 1996; McKinley and Johnson, 2004; Noda and Hiyama, 2015; Zimmerman et al., 2017; Gizowski and Bourque, 2018). De acuerdo con esto, los experimentos electrofisiológicos han demostrado que la tasa de activación de potenciales de acción de las neuronas del SFO y el OVLT puede verse afectada por cambios específicos en la osmolalidad de los fluidos extracelulares (Sayer et al., 1984; Sibbald et al., 1988; Anderson et al., 2000; Ciura and Bourque, 2006; Ciura et al., 2011), o por cambios en la $[\text{Na}^+]$ (Vivas et al., 1990; Anderson et al., 2000; Hiyama et al., 2002; Ciura and Bourque, 2006; Ciura et al., 2011) y así regular la activación de las neuronas efectoras osmorreguladoras río abajo a través de efectos sinápticos (Richard and Bourque, 1995; Trudel and Bourque, 2010; Kim et al., 2021). Curiosamente, las neuronas efectoras osmorreguladoras, tales como las MNC^{VP} y MNC^{OT} , también expresan propiedades intrínsecas de detección osmótica y de Na^+ (Mason, 1980; Oliet and Bourque, 1994; Voisin et al., 1999; Zaelzer et al., 2015). Sin embargo, los efectos de la ablación selectiva de tales propiedades en las MNCs nunca se habían examinado y, por lo tanto, no estaba claro si dichas propiedades contribuyen o no a la regulación de estas neuronas en condiciones fisiológicas. Nuestros experimentos *in vitro* revelan que los canales Nax expresados en las MNC^{VP} y las MNC^{OT} permiten que estas neuronas se despolaricen y exciten gradualmente cuando se exponen a un aumento fisiológicamente relevante en $[\text{Na}^+]_o$ (~ 4 mM) producido en ausencia de un cambio osmótico. Además, los experimentos *in vivo* demostraron que la expresión de Nax en las MNCs contribuye significativamente a la activación de estas neuronas en respuesta a un aumento equivalente de la $[\text{Na}^+]$ en suero. En conjunto, estos hallazgos indican que las MNCs pueden actuar como detectores intrínsecos de Na^+ y, esta propiedad contribuye significativamente a la activación de estas neuronas en condiciones de hipernatremia.

Estudios previos han sugerido que muchos tipos de canales iónicos podrían, potencialmente, mediar la detección de Na^+ en las MNCs. Por ejemplo, se ha reportado que la densidad de los VGSCs de inactivación lenta se mejora por la carga crónica de sal (Waxman et al., 2000). Sin embargo, nuestros datos indican que la corriente de entrada inducida por un estímulo agudo alto en Na^+ no es afectado por la presencia de TTX, el cual es un bloqueador de los VGSCs. Aunque el canal de Na^+ Nav1.9 insensible a TTX se expresa en las MNCs, parece estar completamente inactivado a voltajes cercanos al potencial de reposo de las MNCs (Black et al., 2014). Sin embargo, se ha sugerido que puede existir una pequeña corriente de ventana de estado estable debido a la superposición de las curvas de activación e inactivación en este rango. Si este es el caso, es posible que Nav1.9 pueda tener una pequeña contribución en la detección de Na^+ . Sin embargo, se requieren experimentos adicionales para examinar si los VGSCs insensibles a TTX contribuyen a la corriente, no Na_x , inducida por el aumento de la $[\text{Na}^+]_o$. Por otro lado, experimentos anteriores han demostrado que la densidad de los ENaCs en la membrana de las MNCs aumenta con la ingesta prolongada y elevada de sal, contribuyendo a la despolarización de la membrana en estas condiciones (Sharma et al., 2017). Sin embargo, nuestros datos muestran que las respuestas a estímulos agudos altos en Na^+ no se ven afectados por el bloqueador selectivo de los ENaCs (benzamil). Por lo tanto, los ENaCs no parecen mediar la detección de Na^+ en las MNCs durante perturbaciones agudas en animales hidratados.

Se ha demostrado que los estímulos de Na^+ pueden despolarizar a las MNCs aisladas al aumentar la corriente de fuga que fluye a través de los canales catiónicos inhibidos por el estiramiento. Este efecto se potenció cuando la membrana de las MNCs se encogió por hipertonicidad (Voisin et al., 1999). Estudios recientes han identificado este canal como una variante en el N-terminal de los Trpv1 ($\Delta\text{N-Trpv1}$) (Sharif Naeini et al., 2006; Zaelzer et al., 2015), el cual puede ser bloqueado por su potente antagonista SB366791. Nuestros experimentos mostraron que el SB366791 no reduce significativamente las respuestas inducidas por estímulos de alto Na^+ en las MNCs de rebanadas mantenidas en condiciones isotónicas. Por lo tanto, los canales $\Delta\text{N-Trpv1}$ no median la detección de Na^+ por

parte de las MNCs durante perturbaciones agudas en animales hidratados. No obstante, si los ΔN -Trpv1, ENaC y/o VGSCs contribuyen a la detección de Na^+ en otras condiciones (por ejemplo, deshidratación), sigue sin determinarse.

Trabajos anteriores han demostrado que los canales Na_x se expresan en células gliales del SFO (Shimizu et al., 2007) y del OVLT (Nomura et al., 2019), y que los efectos excitadores del incremento en la $[\text{Na}^+]_o$ en las células de estos núcleos están mediados indirectamente por la liberación de lactato, H^+ y otras cascadas de señalización dependientes de Na_x (Noda and Hiyama, 2015). Sin embargo, de acuerdo con un estudio previo (Nehme et al., 2012), nuestros experimentos indican que en el SON de rata el canal Na_x está expresado en las MNCs pero no en los astrocitos. Esto sugiere que el mecanismo por el cual el canal Na_x despolariza las neuronas del SON puede ser diferente al del SFO y del OVLT. En principio, la corriente entrante inducida por el aumento de la $[\text{Na}^+]_o$ se podría simplemente reflejar con el aumento asociado en la fuerza impulsora del ion. De hecho, las curvas I/V registradas en presencia y ausencia de alto Na^+ fueron paralelas entre sí en voltajes negativos (Figura 13E), como se observó anteriormente (Voisin et al., 1999). Sin embargo, también se observó que un estímulo alto en Na^+ provocó un aumento en la conductancia de membrana al Na^+ en voltajes positivos, dando a la corriente inducida por Na^+ un fuerte grado de rectificación de salida (Figura 13F). Este resultado indica que la corriente entrante inducida en las MNCs por el alto Na^+ resulta en un aumento de la actividad de estos canales. Curiosamente, los canales Na_x expresados en sistemas recombinantes no conducen iones (Noland et al., 2022), sugiriendo que se requieren interacciones con subunidades accesorias y otras proteínas como la Na^+/K^+ ATPasa para formar canales funcionales sensores de Na^+ *in situ* (Berret et al., 2013; Noda and Hiyama, 2015). Asimismo, se requieren experimentos adicionales para establecer el mecanismo molecular subyacente a la activación de los canales Na_x en las MNCs, así como el estudio de la rectificación de salida que el canal Na_x presentó en voltajes positivos.

La conclusión del actual trabajo que la detección de Na^+ por parte de las MNCs requiere canales Na_x , se basa en la observación de que la disminución

selectiva de su expresión utilizando un shRNA específico del gen *Scn7A* redujo significativamente la corriente entrante inducida por la estimulación de Na^+ *in vitro* y la activación neuronal en respuesta a la elevación de $[\text{Na}^+]_o$ *in vivo*. Aunque los análisis inmunohistoquímicos sugirieron que el shRNA solo redujo la expresión de Na_x en un 36 % en comparación con el scRNA, observamos una reducción del 76.6 % en la corriente máxima inducida por alto Na^+ medida en registros de célula completa. Esta observación sugiere que nuestro enfoque inmunohistoquímico subestimó el grado de expresión de Na_x , o que la expresión y la función del canal no están relacionadas linealmente. Curiosamente, un estudio reciente ha demostrado que la expresión de *Scn7A* aumenta en respuesta a la deshidratación (Pauža et al., 2021), lo que sugiere que los canales Na_x pueden contribuir significativamente más a la detección de Na^+ en esta condición.

En la mayoría de las condiciones fisiológicas, los aumentos de la osmolalidad asociados con la pérdida de líquido (por ejemplo, deshidratación) van acompañados de cambios proporcionales en la $[\text{Na}^+]_o$, de modo que ambos parámetros varían en conjunto. No está claro por qué existen mecanismos separados para la detección de Na^+ y osmolalidad. Sin embargo, es importante considerar que estas variables pueden disociarse entre sí en estados patológicos (Iwasaki et al., 1996; Ahloulay et al., 1999). Por ejemplo, la hiperglucemia asociada con la diabetes mellitus es una condición en la que puede ocurrir hiponatremia en ausencia de hipoosmolalidad (Liamis et al., 2014). Así, la existencia de distintos mecanismos de detección osmótica y de Na^+ permiten a las MNCs monitorear estos parámetros por separado, lo que puede conferir una simple redundancia o de aspecto funcional que aún no se ha establecido.

CONCLUSIÓN

El presente estudio indica que las MNCs del SON de rata son detectores intrínsecos de la $[Na^+]_o$. Se determinó, en modelos *in vitro* (rebanadas y células aisladas), que los aumentos en la $[Na^+]_o$ evocan una corriente de entrada de Na^+ lo que resulta en el aumento en la frecuencia de disparo (Figura 17). Además, se demostró que los canales Na_x no se expresan en astrocitos, por lo que estos no son necesarios para la respuesta inducida por Na^+ . Finalmente, se determinó que la reducción selectiva de la densidad de los canales Na_x afectó la activación de las MNC^{VP} en condiciones de hipernatremia sistémica sin afectar la respuesta a la hipertonicidad *in vivo*. Estos resultados sugieren que el canal Na_x , expresado en las MNC^{VP} , tiene un papel fisiológico en la detección de Na^+ el cual contribuye en la generación de las respuestas homeostáticas a la hipernatremia.

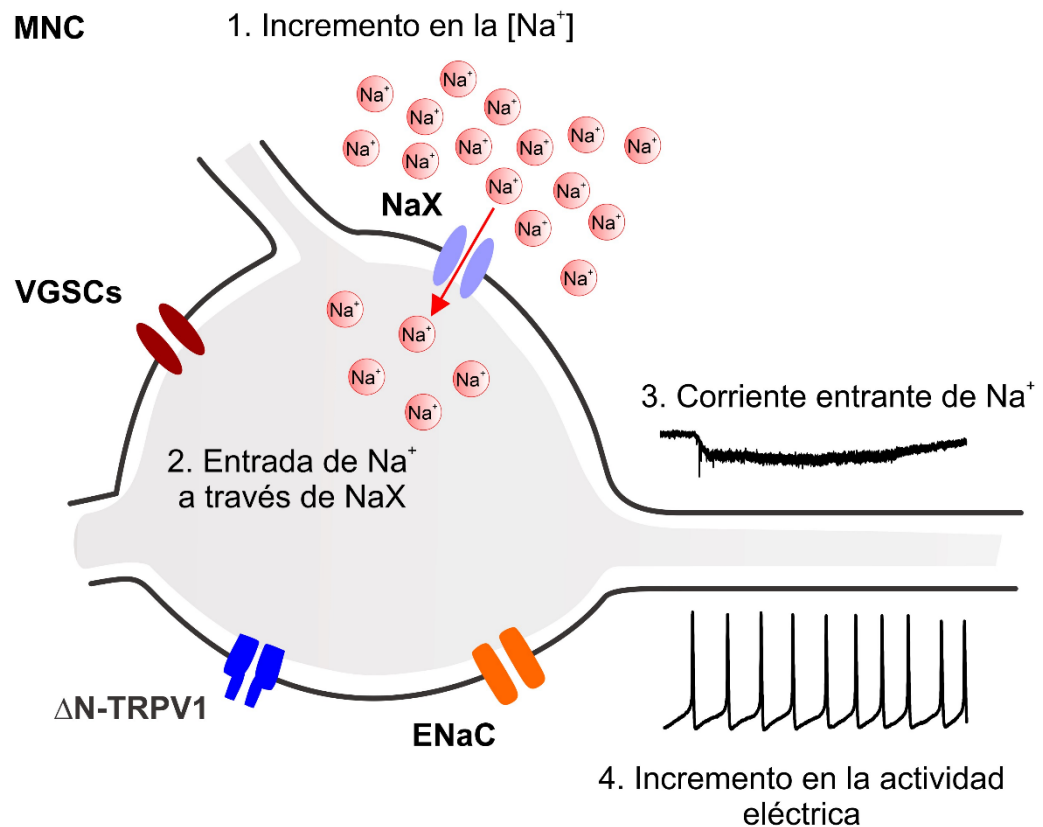


Figura 17 | **Detección de Na^+ por las MNCs.** El incremento de la $[Na^+]_o$ provoca una corriente de entrada de Na^+ a través del canal Na_x resultando en un incremento en la frecuencia de disparo.

BIBLIOGRAFÍA

Ahloulay M, Schmitt F, Dechaux M, Bankir L (1999) Vasopressin and urinary concentrating activity in diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 25:213-222.

Andrew RD, MacVicar BA, Dudek FE, Hatton GI (1981) Dye transfer through gap junctions between neuroendocrine cells of rat hypothalamus. *Science* 211:1187-1189.

Armstrong WE (1995) Morphological and electrophysiological classification of hypothalamic supraoptic neurons. *Prog Neurobiol* 47:291-339.

Armstrong WE, Smith BN, Tian M (1994) Electrophysiological characteristics of immunochemically identified rat oxytocin and vasopressin neurones in vitro. *J Physiol* 475:115-128.

Berret E, Nehme B, Henry M, Toth K, Drolet G, Mougnot D (2013) Regulation of central Na⁺ detection requires the cooperative action of the NaX channel and alpha1 isoform of Na⁺/K⁺-ATPase in the Na⁺-sensor neuronal population. *J Neurosci* 33:3067-3078.

Berret E, Smith PY, Henry M, Soulet D, Hebert SS, Toth K, Mougnot D, Drolet G (2014) Extracellular Na⁽⁺⁾ levels regulate formation and activity of the NaX/alpha1-Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase complex in neuronal cells. *Front Cell Neurosci* 8:413.

Black JA, Vasylyev D, Dib-Hajj SD, Waxman SG (2014) Nav1.9 expression in magnocellular neurosecretory cells of supraoptic nucleus. *Exp Neurol* 253:174-179.

Bourque CW (2008) Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci* 9:519-531.

Bourque CW, Renaud LP (1984) Activity patterns and osmosensitivity of rat supraoptic neurones in perfused hypothalamic explants. *J Physiol* 349:631-642.

Bourque CW, Oliet SH, Richard D (1994) Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol* 15:231-274.

Denton DA, McKinley MJ, Weisinger RS (1996) Hypothalamic integration of body fluid regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7397-7404.

Dolivo D, Rodrigues A, Sun L, Li Y, Hou C, Galiano R, Hong SJ, Mustoe T (2021) The Nax (SCN7A) channel: an atypical regulator of tissue homeostasis and disease. *Cell Mol Life Sci* 78:5469-5488.

Gizowski C, Bourque CW (2018) The neural basis of homeostatic and anticipatory thirst. *Nat Rev Nephrol* 14:11-25.

Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28:365-368.

Goswami C, Hucho T (2008) Submembraneous microtubule cytoskeleton: biochemical and functional interplay of TRP channels with the cytoskeleton. *FEBS J* 275:4684-4699.

Goswami C, Dreger M, Jahnel R, Bogen O, Gillen C, Hucho F (2004) Identification and characterization of a Ca²⁺-sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. *J Neurochem* 91:1092-1103.

Hicks AI, Barad Z, Sobrero A, Lean G, Jacob-Tomas S, Yang J, Choe KY, Prager-Khoutorsky M (2020) Effects of salt loading on the organisation of microtubules in rat magnocellular vasopressin neurones. *J Neuroendocrinol* 32:e12817.

Hirasawa M, Mougnot D, Kozoriz MG, Kombian SB, Pittman QJ (2003) Vasopressin differentially modulates non-NMDA receptors in vasopressin and oxytocin neurons in the supraoptic nucleus. *J Neurosci* 23:4270-4277.

Hiyama TY, Watanabe E, Okado H, Noda M (2004) The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na(x) sodium channels for the control of salt-intake behavior. *J Neurosci* 24:9276-9281.

Hiyama TY, Watanabe E, Ono K, Inenaga K, Tamkun MM, Yoshida S, Noda M (2002) Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat Neurosci* 5:511-512.

Huang W, Lee SL, Sjoquist M (1995) Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl. *Am J Physiol* 268:R634-640.

Hussy N, Deleuze C, Desarmenien MG, Moos FC (2000) Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Prog Neurobiol* 62:113-134.

Iwasaki Y, Kondo K, Murase T, Hasegawa H, Oiso Y (1996) Osmoregulation of plasma vasopressin in diabetes mellitus with sustained hyperglycemia. *J Neuroendocrinol* 8:755-760.

Johnson AK (2007) The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. *Med Sci Sports Exerc* 39:1388-1400.

Johnson AK, Gross PM (1993) Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J* 7:678-686.

Kato A, Fujihara H, Ohbuchi T, Onaka T, Hashimoto T, Kawata M, Suzuki H, Ueta Y (2011) Highly visible expression of an oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene in the hypothalamus and posterior pituitary of transgenic rats. *Endocrinology* 152:2768-2774.

Liamis G, Liberopoulos E, Barkas F, Elisaf M (2014) Diabetes mellitus and electrolyte disorders. *World J Clin Cases* 2:488-496.

Mason WT (1980) Supraoptic neurones of rat hypothalamus are osmosensitive. *Nature* 287:154-157.

McKinley MJ, Johnson AK (2004) The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol Sci* 19:1-6.

McKinley MJ, McAllen RM, Davern P, Giles ME, Penschow J, Sunn N, Uschakov A, Oldfield BJ (2003) The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 172:III-XII, 1-122.

Nehme B, Henry M, Mougnot D, Drolet G (2012) The Expression Pattern of the Na(+) Sensor, Na(X) in the Hydromineral Homeostatic Network: A Comparative Study between the Rat and Mouse. *Front Neuroanat* 6:26.

Noda M, Hiyama TY (2005) Sodium-level-sensitive sodium channel and salt-intake behavior. *Chem Senses* 30 Suppl 1:i44-45.

Noda M, Hiyama TY (2015) Sodium sensing in the brain. *Pflugers Arch* 467:465-474.

Noland CL, Chua HC, Kschonsak M, Heusser SA, Braun N, Chang T, Tam C, Tang J, Arthur CP, Ciferri C, Pless SA, Payandeh J (2022) Structure-guided unlocking of NaX reveals a non-selective tetrodotoxin-sensitive cation channel. *Nat Commun* 13:1416.

Nomura K, Hiyama TY, Sakuta H, Matsuda T, Lin CH, Kobayashi K, Kobayashi K, Kuwaki T, Takahashi K, Matsui S, Noda M (2019) [Na(+)] Increases in Body Fluids Sensed by Central Na(x) Induce Sympathetically Mediated Blood Pressure Elevations via H(+)-Dependent Activation of ASIC1a. *Neuron* 101:60-75.e66.

Ogata N, Ohishi Y (2002) Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *Jpn J Pharmacol* 88:365-377.

Ohbuchi T, Sato K, Suzuki H, Okada Y, Dayanithi G, Murphy D, Ueta Y (2010) Acid-sensing ion channels in rat hypothalamic vasopressin neurons of the supraoptic nucleus. *J Physiol* 588:2147-2162.

Oliet SH, Bourque CW (1992) Properties of supraoptic magnocellular neurones isolated from the adult rat. *J Physiol* 455:291-306.

Oliet SH, Bourque CW (1994) Osmoreception in magnocellular neurosecretory cells: from single channels to secretion. *Trends Neurosci* 17:340-344.

Olsson K (1969) Studies on central regulation of secretion of antidiuretic hormone (ADH) in the goat. *Acta Physiol Scand* 77:465-474.

Olsson K, Kolmodin R (1974) Dependence of basic secretion of antidiuretic hormone on cerebrospinal fluid (Na⁺). *Acta Physiol Scand* 91:286-288.

Pauža AG, Mecawi AS, Paterson A, Hindmarch CCT, Greenwood M, Murphy D, Greenwood MP (2021) Osmoregulation of the transcriptome of the hypothalamic supraoptic nucleus: A resource for the community. *J Neuroendocrinol* 33:e13007.

Peruzzo M, Milani GP, Garzoni L, Longoni L, Simonetti GD, Bettinelli A, Fossali EF, Bianchetti MG (2010) Body fluids and salt metabolism - part II. *Ital J Pediatr* 36:78.

Prager-Khoutorsky M, Bourque CW (2015) Mechanical basis of osmosensory transduction in magnocellular neurosecretory neurones of the rat supraoptic nucleus. *J Neuroendocrinol* 27:507-515.

Prager-Khoutorsky M, Khoutorsky A, Bourque CW (2014) Unique interweaved microtubule scaffold mediates osmosensory transduction via physical interaction with TRPV1. *Neuron* 83:866-878.

Robertson GL, Shelton RL, Athar S (1976) The osmoregulation of vasopressin. *Kidney Int* 10:25-37.

Sharif Naeini R, Witty MF, Seguela P, Bourque CW (2006) An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. *Nat Neurosci* 9:93-98.

Sharma K, Haque M, Guidry R, Ueta Y, Teruyama R (2017) Effect of dietary salt intake on epithelial Na(+) channels (ENaC) in vasopressin magnocellular neurosecretory neurons in the rat supraoptic nucleus. *J Physiol* 595:5857-5874.

Shimizu H, Watanabe E, Hiyama TY, Nagakura A, Fujikawa A, Okado H, Yanagawa Y, Obata K, Noda M (2007) Glial Nax channels control lactate signaling to neurons for brain [Na+] sensing. *Neuron* 54:59-72.

Teruyama R, Sakuraba M, Wilson LL, Wandrey NE, Armstrong WE (2012) Epithelial Na(+) sodium channels in magnocellular cells of the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E273-285.

Ueta Y, Fujihara H, Dayanithi G, Kawata M, Murphy D (2008) Specific expression of optically active reporter gene in arginine vasopressin-secreting neurosecretory cells in the hypothalamic-neurohypophyseal system. *J Neuroendocrinol* 20:660-664.

Ueta Y, Fujihara H, Serino R, Dayanithi G, Ozawa H, Matsuda K, Kawata M, Yamada J, Ueno S, Fukuda A, Murphy D (2005) Transgenic expression of enhanced green fluorescent protein enables direct visualization for physiological studies of vasopressin neurons and isolated nerve terminals of the rat. *Endocrinology* 146:406-413.

Voisin DL, Bourque CW (2002) Integration of sodium and osmosensory signals in vasopressin neurons. *Trends Neurosci* 25:199-205.

Voisin DL, Chakfe Y, Bourque CW (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. *J Neurosci* 20:7743-7751.

Waxman SG, Dib-Hajj S, Cummins TR, Black JA (2000) Sodium channels and their genes: dynamic expression in the normal nervous system, dysregulation in disease states(1). *Brain Res* 886:5-14.

Xu W, Hong SJ, Zhong A, Xie P, Jia S, Xie Z, Zeitchek M, Niknam-Bienia S, Zhao J, Porterfield DM, Surmeier DJ, Leung KP, Galiano RD, Mustoe TA (2015) Sodium channel Nax is a regulator in epithelial sodium homeostasis. *Sci Transl Med* 7:312ra177.

Zaelzer C, Hua P, Prager-Khoutorsky M, Ciura S, Voisin DL, Liedtke W, Bourque CW (2015) DeltaN-TRPV1: A Molecular Co-detector of Body Temperature and Osmotic Stress. *Cell Rep* 13:23-30.

Zimmerman CA, Leib DE, Knight ZA (2017) Neural circuits underlying thirst and fluid homeostasis. *Nat Rev Neurosci* 18:459-469.