



TESIS DE **POSGRADO**

CANALES DE POTASIO
(MAXI-K y K_{ATP})
EN LA ACTIVIDAD
ELÉCTRICA NEURONAL

Juan José Acevedo Fernández

UNIVERSIDAD DE COLIMA

CANALES DE POTASIO
(MAXI-K y K_{ATP})
EN LA ACTIVIDAD
ELÉCTRICA NEURONAL

Juan José Acevedo Fernández

UNIVERSIDAD DE COLIMA

Dr. Carlos Salazar Silva, Rector / **Dr. Justino Pineda Larios**, Secretario General / **Lic. Juan Diego Suárez Dávila**, Coordinador General de Extensión Cultural / **Licda. Guillermina Araiza Torres**, Directora General de Publicaciones

Diseño: Alma Álvarez / Corrección: Gloria González

CANALES DE POTASIO
(MAXI-K y K_{ATP})
EN LA ACTIVIDAD
ELÉCTRICA NEURONAL

Juan José Acevedo Fernández

Colima, México, julio de 2001

© **Derechos reservados**

UNIVERSIDAD DE COLIMA

Avenida Universidad 333

Colima, Col., México

CP 28040

Teléfono 01 (3) 61000, extensión 35004

E-mail: publicac@ucol.mx

<http://www.ucol.mx>

© **Juan José Acevedo Fernández**

Impreso y hecho en México

Printed and made in Mexico

ISBN 970 692 057-9

Trabajo ganador del primer concurso para publicar tesis de posgrado.

Área: *Ciencias Biológicas y de la Salud*

Categoría: *Maestría*

A mi esposa
*Por toda la paciencia que me ha demostrado,
pero que con frecuencia he agotado.*

A mis hijos
*Quienes se alimentarán de los frutos del árbol que
con esfuerzo Sonia y yo mantenemos de pie.*

A mi madre
*Quien tuvo la voluntad y fortaleza para impulsar a
sus hijos hacia adelante, y tiene la satisfacción de ver
que su esfuerzo no fue en vano.*

A mis hermanos
*Dijo la Cumbre al Abismo: "Desde mi altura,
contemplo la total extensión del planeta y la infinitud
del firmamento, y tú, qué haces allá abajo?".
Respondió el Abismo: "Te sostengo".*
E. Solary

A mis amigos
*Un verdadero amigo es el que no interfiere en nuestro camino,
excepto cuando vamos en descenso.*
E. Esar

A mis maestros
*No han necesitado maestros aquellos a los que la
naturaleza destinó para tener discípulos.*
JJ. Rousseau

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Onetti

Por su paciencia, asesoramiento y apoyo en el desarrollo del proyecto y la escritura de la tesis

A la Dra. Esperanza García

Por su apoyo durante la fase inicial del proyecto, cuando más se requiere de ayuda.

Al Dr. J. Jesús Lara

Por su disposición de ayudar incondicionalmente durante los experimentos y en la elaboración de las pipetas de registro.

A la Dra. Irene de la Peña Peralta

Por su apoyo durante los semestres iniciales para que pudiera mantenerme en el camino.

A todos los investigadores del centro

Por su paciencia y dedicación en la formación de nuevos investigadores.

A Lupita

Por su ayuda administrativa

A Juan Carlos Muñoz

Por su trabajo de fotografía

A mis compañeros

Por su apoyo y amistad durante el curso de la maestría

A todos

Los que de alguna forma hicieron posible este trabajo, gracias.

Índice

Introducción

Regulación hormonal en los crustáceos	11
Sistema órgano X-glándula sinusal	11
Actividad eléctrica endógena y secreción de hormonas	12
Propiedades de membrana en las neuronas que descargan en ráfagas	15
Metabolismo celular y excitabilidad	16

Objetivos

Objetivo general	18
Objetivos específicos	18

Materiales y métodos

Obtención de la preparación	19
Soluciones	21
Pipetas	22
Sistema de registro	23
Parámetros electrofisiológicos	23

Resultados

Actividad eléctrica en los somas del OX	25
1. Participación de los canales de potasio en la actividad electrofisiológica	27
Participación de los canales de potasio activados por calcio sobre la actividad eléctrica en las neuronas que descargan en ráfagas	27
Participación de los canales de potasio sensibles a ATP sobre la actividad eléctrica de las neuronas que descargan en ráfagas	31
Efectos sobre la actividad electrofisiológica al bloquear los canales de potasio activados por calcio y los sensibles a ATP	34
2. Contribución de los canales de potasio a la corriente saliente total	38
Contribución de la corriente de potasio activada por calcio a la corriente saliente total	38
Contribución de la corriente de potasio sensible a ATP a la corriente saliente total	42
La corriente de potasio activada por calcio y la sensible a ATP están presentes en una misma neurona	44

Discusión

La mayoría de las neuronas del OX tienen actividad espontánea en ráfagas 47

Participación de los canales maxi-K y K_{ATP}
en la actividad eléctrica..... 49

Contribución de los canales maxi-K y K_{ATP} a la corriente saliente 50

Glucosa y glibenclamida, diferente efecto sobre la actividad eléctrica 51

Metabolismo de la glucosa y los canales K_{ATP} y maxi-K 51

Conclusiones

Participación de los canales maxi-K y K_{ATP} en la actividad eléctrica.....53

Contribución de los canales maxi-K y K_{ATP} en la corriente saliente total53

Bibliografía55

Índice de figuras y tablas58

Introducción

Regulación hormonal en los crustáceos

La modulación de las funciones de los organismos se lleva a cabo mediante la acción de hormonas que funcionan como mensajeros intercelulares, participando en la integración funcional necesaria para mantener el equilibrio interno.⁷ Las hormonas regulan ciertas funciones corporales durante periodos sostenidos que pueden ser de algunas horas o hasta meses y su acción puede observarse incluso en invertebrados, en los que se han identificado diversas sustancias hormonales.

El acocil, al igual que otros crustáceos decápodos, presenta cambios estacionales mensuales o durante el día, en procesos tan importantes como la locomoción, la coloración de los tejidos, el consumo de oxígeno, el metabolismo de carbohidratos, los procesos de muda y de reproducción. Estos cambios están regulados por factores ambientales tales como la luz y la temperatura, pero el control de los mismos se lleva a cabo a través de hormonas que son secretadas en algunos órganos y tejidos, como el tallo ocular, el ganglio cerebroide o el tejido pericárdico del acocil.

Sistema órgano X-glándula sinusal

En la médula terminal del tallo ocular de los crustáceos decápodos se encuentran los somas neuronales que componen el sistema neuroendocrino más importante conocido como sistema órgano X-glándula sinusal (OX-GS) (**figura 2B**). La función principal del sistema OX-GS es liberar hormonas peptídicas que regulan diversas funciones durante el desarrollo y la adaptación al medio ambiente. Este sistema es análogo funcionalmente al sistema hipotálamo-neurohipófisis de los mamíferos. En ambos sistemas el mecanismo de neurosecreción es básicamente el mismo y ambos sistemas producen y secretan neuropéptidos que participan en la regulación y homeostasis de varios procesos fisiológicos.³¹

Desde el punto de vista funcional, el sistema OX-GS puede dividirse en tres compartimentos: los cuerpos neuronales (somatas) que componen el órgano X (OX), el tracto axónico y las terminales nerviosas que forman la glándula sinusal.¹⁰ La síntesis y el empaquetamiento de los productos hormonales en pequeños gránulos ocurren exclusivamente en los somatas, de aquí son transportados a través de las proyecciones axónicas hasta las terminales nerviosas que constituyen la glándula sinusal (GS), donde se almacenan y liberan a la hemolinfa por exocitosis.¹⁷

Desde el punto de vista morfológico, el sistema OX-GS presenta las siguientes características:

A) Es un sistema heterogéneo formado por 6 tipos diferentes de células, que se diferencian por su tinción histológica, inmunorreactividad selectiva y estructura microscópica.²⁹

B) Más del 90% de los somatas que componen el OX poseen axones cuyas terminaciones están en la GS.

C) Del segmento proximal de los axones surgen pequeñas arborizaciones colaterales que forman la neuropila, la cual puede ser el sitio de regulación por medio de sinapsis química.³

D) La neuropila es una estructura compuesta por ensanchamientos de la parte proximal del axón, estas dilataciones se encuentran en la periferia con la cara exterior hacia la hemolinfa.⁴²

Debido a que el OX está formado por 6 tipos de células distintas, cada una con la maquinaria biosintética suficiente para producir al menos un tipo de hormona, la GS funciona como depósito y fuente de secreción de al menos 6 tipos de hormonas. De esta glándula se han aislado y secuenciado diversos productos hormonales cuya función ha sido esclarecida mediante ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre ellas se encuentra la hormona hiperglucemiante, la hormona cardioaceleradora, la hormona inhibitoria de la función de las gónadas, la hormona inhibitoria de la muda y las hormonas concentradora y dispersora de pigmentos.^{11, 14, 40}

Actividad eléctrica endógena y secreción de hormonas

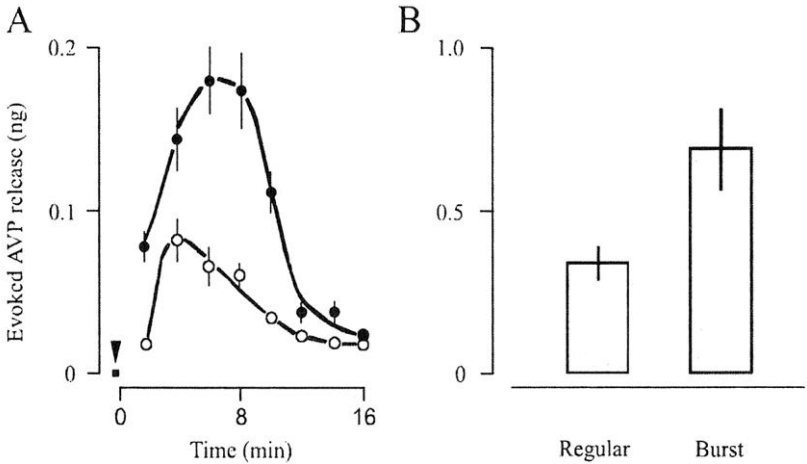
El sistema OX-GS de los crustáceos, además de secretar hormonas, tiene la capacidad de ser excitable, es decir, que las células que forman parte del OX descargan potenciales de acción, ya sea espontáneos o estimulados, de manera semejante a otras preparaciones neuronales de moluscos y de mamíferos. Estas células son capaces de responder a

estímulos por medio de cambios eléctricos rápidos en la membrana celular. Esta actividad eléctrica está determinada por el movimiento de iones que cruzan la membrana plasmática a través de los canales iónicos, generando las corrientes iónicas responsables del potencial de acción.

Las neuronas del OX tienen diferentes patrones de actividad eléctrica: silentes que generan potenciales de acción al ser estimuladas y espontáneas que pueden presentar descarga rítmica, irregular o agrupada en ráfagas. A cada patrón de actividad eléctrica endógena corresponde una relación particular entre la corriente y el voltaje transmembrana. Las células silentes tienen resistencias de entrada bajas y presentan potenciales de reposo de aproximadamente -70 mV, mientras que las neuronas con actividad rítmica tienen resistencias de membrana mayores y potenciales de reposo más positivos (alrededor de -60 mV). Las células que descargan en ráfagas poseen una resistencia de entrada alta y una región con pendiente negativa (NSR) en la curva corriente-voltaje (I-V), ocasionando que la neurona presente un potencial de membrana inestable, que oscila entre -45 y -30 mV, valores que caen dentro de la NSR.³²

La diversidad de patrones de actividad eléctrica endógena influye directamente sobre la secreción de hormonas. Esto ha sido demostrado en otros sistemas neuroendocrinos análogos al sistema OX-GS, como el sistema hipotálamo-neurohipófisis, en donde se observa una relación estrecha entre el patrón de descarga de los cuerpos celulares neurosecretores y la cantidad de hormona liberada de las terminales nerviosas.³¹ En este sistema, el patrón de actividad con potenciales de acción agrupados en ráfagas es el más efectivo para la secreción de hormonas;^{8, 31, 42} **(figura 1)**.

Figura 1



Actividad eléctrica y secreción de hormonas en el sistema hipotálamo-neurohipófisis de mamíferos: liberación de vasopresina inducida por la estimulación del lóbulo neural aislado. **A**, curso temporal de la liberación de vasopresina inducida por un patrón de estímulos en ráfaga con una frecuencia constante de 13 Hz (●) o por el mismo número de estímulos a una frecuencia constante de 13 Hz (○). La barra (▼) indica la duración del estímulo. **B**, liberación total de vasopresina inducida por 348 pulsos regulares o en ráfagas a una frecuencia media de 13 Hz (tomada de Nordmann y Raji, 1990).

Uno de los mecanismos fundamentales en el proceso de secreción es el acople excitación-secreción, originalmente propuesto por Douglas y Rubin en 1963; esto es, la secuencia de eventos que median entre la propagación del potencial de acción desde el cono axónico y la liberación de hormonas almacenadas en la GS. Este mecanismo involucra una despolarización de las terminales nerviosas debido a la propagación del potencial de acción. La despolarización produce la entrada de iones de calcio que incrementa sus niveles citosólicos, y este calcio libre es esencial tanto para la fusión del gránulo de neurosecreción en la membrana terminal, como para la liberación del contenido granular hacia el espacio extracelular por exocitosis.^{28, 30, 36} Existen evidencias directas de que los potenciales de acción propagados que invaden las terminales nerviosas de la GS de los crustáceos, causan la liberación de hormonas.²⁴

Propiedades de membrana en las neuronas que descargan en ráfagas

Las neuronas del órgano X generan oscilaciones rítmicas del potencial de membrana, las cuales disparan ráfagas de potenciales de acción durante las fases de despolarización. Al terminar la ráfaga se produce una repolarización rápida seguida por una despolarización lenta que genera una nueva ráfaga.² Dichas oscilaciones son endógenas, ya que el aislamiento físico o químico de sus entradas sinápticas no inhibe la actividad en ráfagas rítmicas, como ha sido demostrado en otras preparaciones.¹⁵

En 1975, Barker y Gainer encontraron que el patrón de actividad en ráfagas requiere la presencia de cationes divalentes, una resistencia de membrana efectiva mínima, y una relación I-V no lineal en las células ganglionares de moluscos. Onetti y cols., en 1990, también encontraron esta relación no lineal en la curva I-V (en estado estable) de las neuronas del OX con actividad en ráfagas. La curva I-V tiene una NSR, región que se atribuye a la activación de una corriente fónica entrante denominada INSR, insensible a la tetrodotoxina (TTX). Esta corriente puede ser acarreada por iones de sodio y se contrapone a la corriente saliente de potasio que hiperpolariza y estabiliza la célula.

El mecanismo de la generación de las ráfagas es semejante al potencial marcapaso del miocardio: la fase hiperpolarizante es debida a la activación de una conductancia de potasio, la cual inactiva lentamente. Esto produce una despolarización gradual hasta que se activa una corriente entrante dependiente de voltaje que conduce a una despolarización rápida y el inicio de la ráfaga de espigas. El potencial de membrana continúa despolarizado durante la ráfaga debido al componente de corriente entrante que no inactiva (INSR). Al final de la ráfaga se activan las corrientes de potasio dependientes del voltaje que repolarizan la célula y producen la hiperpolarización post-ráfaga. La fase despolarizante es entonces el resultado de una conductancia de sodio sobre una conductancia de potasio dependiente del tiempo y del voltaje, y su amplitud (oscilación del potencial de membrana de la hiperpolarización al umbral) está correlacionada con la INSR. Durante la oscilación del potencial de membrana, la corriente saliente es máxima en la hiperpolarización post-ráfaga y disminuye gradualmente con la despolarización hasta ser mínima en el umbral del potencial de acción.⁴¹

En resumen, dos propiedades de membrana que están asociadas con la actividad de potenciales de acción en ráfagas son: 1. Una conductancia

de sodio (INSR) sin inactivación, insensible a TTX, con un componente independiente y otro dependiente al voltaje; y 2 una conductancia de potasio dependiente de tiempo y de voltaje. Por lo tanto, las células que generan potenciales de acción en ráfagas tienen propiedades que dependen del tiempo y del potencial de membrana.⁶

Metabolismo celular y excitabilidad

Recientemente se ha considerado la importancia del metabolismo celular como factor modulador de la excitabilidad, principalmente en células sensibles a los cambios de concentración extracelular de glucosa. En 1974, Oomura y cols., reportaron neuronas quimiosensibles cuya actividad eléctrica era influenciada por el nivel de glucosa en el medio extracelular. Estas neuronas se localizan en el área lateral y en el núcleo ventromedial del hipotálamo de la rata, donde se encuentran los centros que regulan el apetito y la saciedad, respectivamente. Según su respuesta a la glucosa, se les denomina glucosensibles (GSS) o glucorreceptoras (GR): las GSS disminuyen su actividad debido a una hiperpolarización mientras que las GR se despolarizan e incrementan su actividad.³⁵ Uno de los mecanismos implicados en la despolarización producida por la glucosa es el decremento en la conductancia al potasio,^{4, 26, 27} debido posiblemente al cierre de los canales de potasio sensibles al ATP (K_{ATP}) presentes en la membrana celular.^{9, 5} En otras regiones del cerebro de mamíferos también se han encontrado neuronas que responden a la glucosa extracelular, como son la sustancia nigra,³⁸ el cerebro posterior³⁷ y el núcleo del tracto solitario.²¹ Sin embargo, estas neuronas sensibles a glucosa no son exclusivas de los mamíferos ya que también se han encontrado en algunas especies de invertebrados. En 1993, García y cols., observaron que la actividad eléctrica del sistema OX-GS de los crustáceos decápodos también es modulada por los niveles extracelulares de glucosa. Estos investigadores observaron que la glucosa modifica de manera reversible la actividad eléctrica de las neuronas del OX: puede una despolarización del potencial de membrana, un incremento en la frecuencia de descarga de potenciales de acción y un cambio en el patrón de descarga (de ráfagas a tónica). Estos experimentos parecen aportar la evidencia electrofisiológica de la participación de la glucosa en un sistema de autorregulación de sus niveles circulantes en la hemolinfa de los crustáceos decápodos, mediante un mecanismo de retroalimentación negativa sobre la secreción de la hormona hipergluceante en algunas neuronas del OX.³⁹ En el mismo trabajo, García y cols., en-

contraron que la glucosa bloqueaba una corriente de potasio, la cual podría participar en los efectos sobre la actividad eléctrica a través del ATP, producto de su metabolismo.

En 1996, Onetti y cols., caracterizaron los canales de potasio sensibles a glucosa en los somas del OX con las siguientes propiedades: tienen una conductancia de 112 pS, son selectivos para iones de potasio, son dependientes del voltaje, son inhibidos intracelularmente por ATP y por glibenclamida, son activados por el Mg-ADP, y requieren calcio intracelular para ser activados. Estas propiedades permiten considerar a los canales de potasio sensibles a glucosa de las neuronas del OX como un subtipo de canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}), ya que la activación de estos canales es dependiente de voltaje y su actividad puede ser regulada por la relación $[ATP]/[ADP]$, así como por el cociente $[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}]$.

Experimentos recientes sugieren que los efectos de la glucosa sobre la actividad eléctrica de los somas del OX pueden ser mediados por otros canales de potasio, además de los canales K_{ATP} , ya que se han encontrado canales de potasio activados por Ca^{2+} y por Mg-ATP, con una conductancia de 219 pS y dependientes de voltaje, en estas células.²³ Tanto los canales de potasio sensibles a ATP como los activados por Ca^{2+} pueden ser regulados por el ATP producido durante el metabolismo celular, por lo que pueden considerarse parte de un sistema complejo de regulación de la excitabilidad de acuerdo a la condición metabólica de las células. Sin embargo, la participación de estos canales en la actividad eléctrica y su contribución en la corriente saliente total de las neuronas del OX aún no está determinada.

Objetivo

Objetivo general

Estudiar la contribución de la corriente de potasio activada por calcio ($I_{\text{maxi-K}}$) y de la corriente de potasio sensible a ATP ($I_{\text{K}_{\text{ATP}}}$) en la corriente saliente total y su participación en la modulación de la actividad eléctrica en las neuronas secretoras de acocil.

Objetivos específicos

1. Estudiar la participación de los canales maxi-K y K_{ATP} en los potenciales de acción, bloqueando a cada uno de ellos.
2. Determinar la contribución de los canales K_{ATP} y maxi-K en la corriente saliente total, bloqueando la corriente de calcio, la corriente maxi-K o la corriente K_{ATP} .

Materiales y métodos

Los experimentos se realizaron en acociles *Procambarus clarkii* adultos, hembras y machos, fuera de la época de muda, con longitud corporal entre 8.5 y 10.5 cm (**figura 2A**). Los animales se mantuvieron en charolas con agua a una profundidad entre 2 y 3 cm; se alimentaron con zanahoria *ad libitum* y pescado una vez por semana; estuvieron expuestos al fotoperiodo natural y a una temperatura ambiental entre 22 y 25°C, misma a la que se realizaron los experimentos.

Obtención de la preparación

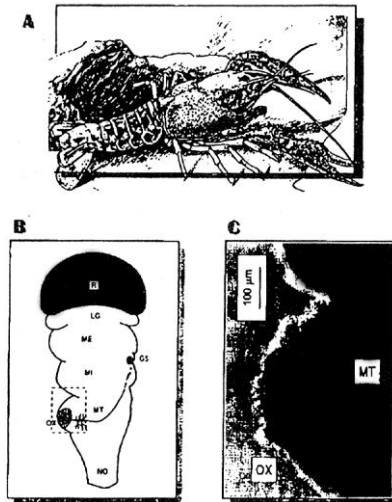
Para obtener la preparación biológica se practicó la ablación del pedúnculo óptico del acocil, colocándose en una caja de Petri con solución salina fisiológica para crustáceos, cuya composición (control_FC) se muestra en la **tabla 1**. Mediante la microdissección bajo un microscopio estereoscópico se eliminó el exoesqueleto, el músculo y el tejido conectivo que cubre el tallo ocular. De esta manera quedan expuestos y visibles al microscopio los cuerpos neuronales del OX (**figura 2C**). Para el registro del potencial de membrana se utilizó el tallo ocular completo, mientras que para el registro de corriente las neuronas se axotomizaron cortando del tallo ocular únicamente la región del OX. El tallo ocular completo o el OX axotomizado se colocaron en la parte central de una cámara de acrílico de tres compartimentos, interconectados entre sí con una capacidad total de 1 ml de volumen (**figura 3**). La interconexión de los compartimentos, mediante un sistema de perfusión, permite reemplazar continuamente las soluciones externas utilizadas en los experimentos, a un flujo constante de 600 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ (1 gota/5 segundos).

Tabla 1
Composición de las soluciones (en mM)

	<i>Control FC</i>	<i>Externas</i>		<i>Pipetas</i>	
		<i>Control FV</i>	<i>0Ca</i>	<i>FC</i>	<i>FV</i>
NaCl	200			44	
KCl	5.4	5.4	5.4		229
MgCl ₂	13.5	13.5			
HEPES-NaOH	2		13.5		
Aspartato-KOH	10			185	
HEPES-KOH				10	10
Glucamina-HCl		203	203		
HEPES-glucamina		10	10		

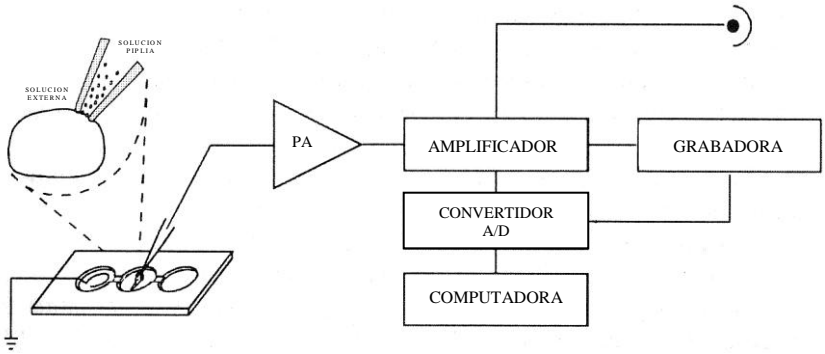
El pH de las soluciones externas fue ajustado a 7.4 y el de las soluciones de las pipetas a 7.2

Figura 2



Localización del sistema órgano X-glándula sinusal en el acocil: **A**, morfología externa del acocil *Procamburus clarkii*. **B**, esquema que muestra las estructuras internas del tallo ocular: R, retina; LG, lámina ganglionar; ME, médula externa; MI, médula interna; MT, médula terminal; NO, nervio óptico; OX, órgano X; GS, glándula sinusal. **C**, microfotografía de los cuerpos neuronales del órgano X expuestos después de la disección del tejido muscular y conectivo que los recubre.

Figura 3



Esquema de dispositivo experimental. Se ilustra la posición del tallo ocular en la cámara de acrílico conectada a tierra a través de un electrodo de Ag/AgCl, la posición de la pipeta conectada al amplificador a través del preamplificador (PA), la conexión del amplificador al osciloscopio, a la videgrabadora y a la computadora a través del convertidor A/D. El inserto ilustra la posición de la pipeta con nistatina adherida a la membrana celular.

La región donde se localiza el OX se identificó visualmente con un microscopio invertido Nikon TMD, y para colocar las pipetas en la superficie de las células se utilizó un micromanipulador Burleigh PCS-800.

Soluciones

La composición de las soluciones utilizadas tanto en fijación de corriente como en fijación de voltaje, se muestra en la **tabla 1**. Todas las neuronas estudiadas fueron perfundidas extracelularmente con la solución salina control_FC durante un periodo de 30 minutos antes de los experimentos, y por 10-20 minutos después de obtener el parche perforado con nistatina para permitir el equilibrio de los iones monovalentes de la pipeta con los del medio intracelular.

En los experimentos de fijación de corriente se perfundieron las soluciones experimentales durante 3-8 minutos; posteriormente se procedió a lavar la preparación perfundiendo nuevamente la solución salina control_FC durante 20-30 minutos o hasta alcanzar nuevamente la actividad eléctrica control.

En los experimentos de fijación de voltaje, se perfundió la solución control_FV durante 10-20 minutos para eliminar la corriente de sodio

antes de obtener los registros de corriente control. Posteriormente se perfundieron las soluciones experimentales el tiempo necesario para bloquear las corrientes iónicas estudiadas (2-8 minutos), y para observar su recuperación se perfundió nuevamente la solución control_FV durante 15 minutos. Después de ese tiempo, se perfundió la solución salina fisiológica control_FC por lo menos durante 90 minutos antes de obtener los registros de corriente de otra neurona.

Las soluciones experimentales, preparadas al momento de ser utilizadas, se obtuvieron agregando a las soluciones control: cloruro de tetraetilamonio (TEA) 1 mM, caribdotoxina (CTX) 100 nM, glibenclamida (GLI) 50 μ M o cloruro de cadmio (Cd) 0.4 mM.

A las soluciones de las pipetas se les agregó 300 μ g/ml de nistatina, previamente disuelta en dimetilsulfóxido a la concentración de 25 mg/ml. Estas soluciones fueron mezcladas con un sonicador (agitador ultrasónico), y filtradas usando membranas con poros de 0.22 μ m antes de llenar las pipetas. La punta de las pipetas se llenó con la solución sin nistatina (FC o FV) y el cuerpo de las pipetas se llenó con la misma solución, a la que se le agregó nistatina.

Pipetas

Las pipetas utilizadas para registrar el potencial de membrana o las corrientes iónicas de las neuronas del OX, se fabricaron con capilares de borosilicato (de 1.5 mm y 0.86 mm de diámetro externo e interno, respectivamente). La elaboración de las pipetas se realizó en tres etapas: a) estiramiento de la pipeta; b) recubrimiento de la pipeta con un polímero aislante; y c) pulimento de la punta de la pipeta. El estiramiento se realizó en un estirador de pipetas Narishige de dos etapas: la primera de pre-estiramiento para reducir el diámetro del capilar y para formar el cuello de la pipeta; y la segunda, la más importante, para determinar el diámetro de apertura de la punta. Las puntas de las pipetas fueron recubiertas con Sylgard para reducir la capacitancia de la pipeta y el nivel de ruido de los registros, principalmente en los de corriente. Por último, las puntas de las pipetas fueron pulidas por el calor del filamento incandescente de una microforja. Con el pulimento se alisaron los bordes y se removieron las partículas de basura de la punta. La resistencia eléctrica de las pipetas así fabricadas, después de llenarlas con las soluciones FC o FV, fue de 3 a 6 M Ω .

Sistema de registro

Para estudiar la participación de los canales maxi-K y K_{ATP} en la actividad eléctrica, y su contribución en la corriente saliente, se utilizó la técnica del parche perforado con nistatina²⁰, en dos modos de registro: fijación de corriente y fijación de voltaje. Los registros del potencial de membrana y los de corriente fueron obtenidos con un amplificador Axopatch 200B (*Axon Instruments Inc*), el cual permite cambiar el modo de registro, mantener un potencial de mantenimiento, compensar el offset y la capacitancia de la pipeta, la resistencia en serie, la capacitancia de la célula y la corriente de fuga. Con este mismo equipo, las señales eléctricas registradas también fueron filtradas y amplificadas. Los registros de potencial de membrana fueron filtrados a 5 kHz y amplificados con una ganancia de 10, mientras que los de corriente iónica fueron filtrados a 2 kHz y amplificados con una ganancia de 20 o 50 (según la intensidad de corriente de la célula). Los registros filtrados y amplificados fueron monitoreados en un osciloscopio y en el monitor de una computadora, a través de un convertidor analógico-digital. En la adquisición de los registros en la computadora se utilizó el programa Clampex del pCLAMP 6.0.2 (*Axon Instruments Inc*), el cual también se utilizó para la estimulación de las neuronas que no descargaban potenciales de acción espontáneos en fijación de corriente, y para el cambio del potencial de membrana de la neurona en fijación de voltaje. Los registros del potencial de membrana fueron grabados en una videograbadora a través de un convertidor PCM. Estos datos fueron adquiridos en la computadora con el programa Axotape (potenciales de acción simples) o Fetchex del pClamp (ráfagas de potenciales de acción), a través de un convertidor analógico-digital. En el análisis de los datos se utilizaron los programas Clampfit y Fetchan del pClamp, y en la elaboración de las figuras se utilizaron los programas Origin y Corel Draw. La **figura 3** muestra un esquema del dispositivo experimental.

Parámetros electrofisiológicos

En las neuronas con actividad en ráfagas se estudió la participación de los canales maxi-K y K_{ATP} en la frecuencia de descarga, el número de espigas por ráfaga y la duración de los potenciales de acción de la ráfaga (medidos al 50% de su amplitud). Se compararon todos los potenciales de acción de una ráfaga para cada condición experimental: control y en presencia de los bloqueadores. Con el fin de observar el efecto de los

bloqueadores utilizados sobre la duración de todos los potenciales de acción de la ráfaga, se construyeron curvas duración al 50% de amplitud contra el número de potencial de la ráfaga en las condiciones control y en presencia de los bloqueadores. Para observar el efecto sobre la frecuencia, el número de potenciales por ráfaga y la duración del potencial de acción, se adquirió la actividad eléctrica de las neuronas del OX con distinta escala temporal, en condiciones control y en presencia del bloqueador. Con la escala temporal mayor se adquirió, durante un minuto, para observar al menos dos ráfagas y medir el periodo entre ellas; con la escala intermedia se adquirió la primer ráfaga del registro anterior para observar el número de espigas por ráfaga; y con la escala menor se adquirió el primer potencial de la primera ráfaga.

Para estudiar la contribución de los canales maxi-K y K_{ATP} en la corriente saliente total, se registraron las corrientes iónicas de las neuronas del OX con la técnica del parche perforado en el modo de fijación de voltaje. El protocolo para obtener los registros de corriente fue el siguiente: las células se mantuvieron a un potencial de -50 mV y desde este potencial se aplicó un pulso de voltaje despolarizante cada tres segundos, a partir de -40 mV hasta alcanzar un potencial de membrana de +60 mV, con incrementos de 10 mV. La duración de estos pulsos fue de 160 ms. Con el fin de obtener una mejor fijación espacial y temporal del potencial de membrana, las neuronas fueron axotomizadas. El tracto axónico se cortó lo más cerca del OX antes de fijarlo con los alfileres en la cámara de perfusión.

A partir de los registros de corriente de membrana se elaboraron las curvas I-V de las corrientes de potasio en condiciones control y en presencia de los bloqueadores, y mediante la resta de estas curvas se construyó la curva I-V para la corriente de potasio inhibida por el bloqueador. El registro de esta última se obtuvo al restar los registros obtenidos en condiciones de bloqueo de los registros obtenidos en condiciones control.

Resultados

Los resultados que se reportan en este trabajo pueden dividirse en dos grupos: 1. Los obtenidos con la técnica de parche perforado, en fijación de corriente, con los que se estudió la participación de los canales de potasio activados por calcio y de los sensibles a ATP en la actividad eléctrica de las neuronas del OX; y 2. Los obtenidos con esta misma técnica, pero en fijación de voltaje para registrar las corrientes iónicas de estas neuronas, con los que se evaluó la contribución de esos canales en la corriente total de la célula completa.

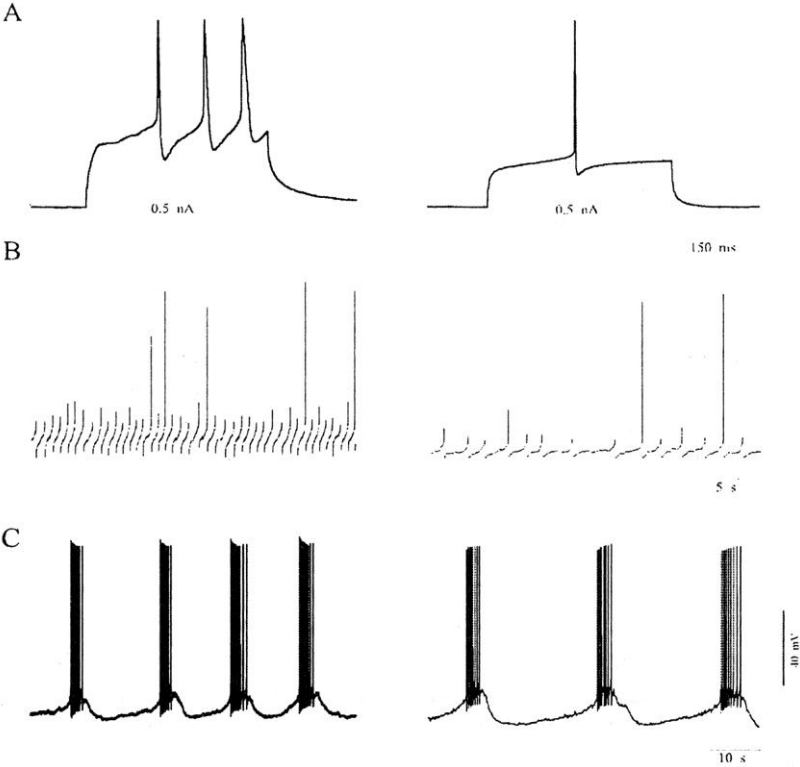
En todos los experimentos, primero se registró temporalmente la actividad eléctrica de canales unitarios localizados en el área de membrana cubierta por la pipeta (configuración cell-attached). Después de 3 a 10 minutos, la nistatina contenida en la pipeta formó los poros a través de la membrana que permitieron el acceso eléctrico al medio intracelular, de manera que la corriente registrada fue resultado de la actividad eléctrica de todos los canales de la célula (configuración whole-cell). Una vez obtenida esta configuración, se esperó entre 10 y 20 minutos para el equilibrio de los iones monovalentes de la solución de la pipeta con los del medio intracelular. Después de este tiempo, se cambió el modo de registro a fijación de corriente en el amplificador para registrar el potencial de membrana de las neuronas del OX. Durante todo el tiempo previo a este momento, la solución externa fue la solución salina fisiológica para crustáceos (control_FC, **tabla 1**). Esta solución se cambió por la control_FV en los experimentos de fijación de voltaje, en la que el sodio se sustituyó por el catión orgánico N-metilglucamina. La solución control_FV se perfundió durante al menos 10 minutos para eliminar la corriente de sodio antes de obtener los registros.

Actividad eléctrica en los somas del OX

La actividad eléctrica registrada en 46 somas neuronales del OX fue de tres tipos: silente, tónica y en ráfagas (**figura 4**). La probabilidad de encontrar cada tipo de actividad no fue la misma, por lo que se encontró un patrón específico con mayor frecuencia. Del total de neuronas registradas (46), 9 de ellas fueron silentes, 6 fueron tónicas y 31 descar-

garon potenciales de acción agrupados en ráfagas. Expresado de otra manera: 20% de las células fueron silentes, 13% fueron tónicas y 67% presentaron actividad en ráfagas (**tabla 2**).

Figura 4



Diferentes patrones de actividad eléctrica en las neuronas del OX. Registros del potencial de membrana de diferentes neuronas: dos que disparan potenciales de acción unitarios o en ráfaga al ser estimulados (A), dos que descargan espontáneamente en forma regular (B), y otras dos que descargan en ráfagas (C). Los trazos inferiores del panel A representan los pulsos de corriente aplicados a través del electrodo de registro para estimular las neuronas.

Las neuronas del OX son parte de un sistema neurosecretor y su actividad eléctrica está relacionada con su función endocrina. Por lo tanto, la observación con mayor frecuencia de los patrones en ráfagas concuerda con la función endocrina de este sistema en el acocil, debido

a que se ha reportado que este tipo de actividad es el más efectivo para la secreción.^{8, 31, 42}

La actividad eléctrica en ráfagas está más involucrada en la secreción de hormonas y es la observada con mayor frecuencia en las neuronas del OX. Por esta razón, el efecto sobre la actividad eléctrica del bloqueo de los canales de potasio activados por calcio y de los sensibles a ATP se estudió únicamente en las neuronas con este tipo de actividad.

Tabla 2
% Actividad eléctrica

Tipo de actividad	No. Células	% Células
Silente	9	20
Tónica	6	13
Ráfagas	31	67
Total	46	100

1. Participación de los canales de potasio en la actividad electrofisiológica

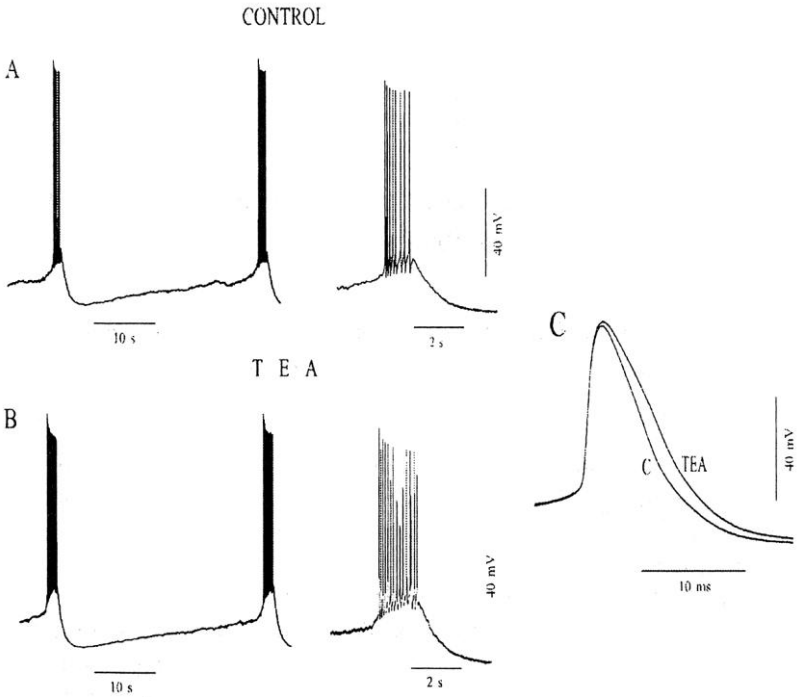
Participación de los canales de potasio activados por calcio sobre la actividad eléctrica en las neuronas que descargan en ráfagas

La participación de los canales maxi-K en las células con actividad eléctrica en ráfagas fue estudiada utilizando dos tipos de bloqueadores: tetraetilamonio (TEA) a una concentración de 1 mM (**figuras 5 y 6**) y caribdotoxina (CTX) a una concentración de 100 nM (**figuras 7 y 8**).

En las **figuras 5 y 6** se observan los efectos de la aplicación de TEA. En la **figura 5**, en dos escalas de tiempo diferentes, se muestran los registros en condiciones control (**figura 5A**) y al agregar 1 mM de TEA (**figura 5B**). En la **figura 5C** pueden observarse registros típicos del primer potencial de acción de una ráfaga en condiciones control y en presencia de 1 mM de TEA. El mayor efecto del TEA fue sobre la duración de los potenciales de acción y de las ráfagas, aumentando un 25% y un 38% (n=7), respectivamente (**tabla 3**). El incremento en la duración se observa en todos los potenciales de acción de la ráfaga, como se muestra en la **figura 6**. Al retirar el TEA de la solución externa, los potenciales de acción recuperan la duración que tenían en las condiciones control. La duración y el número de espigas por ráfaga

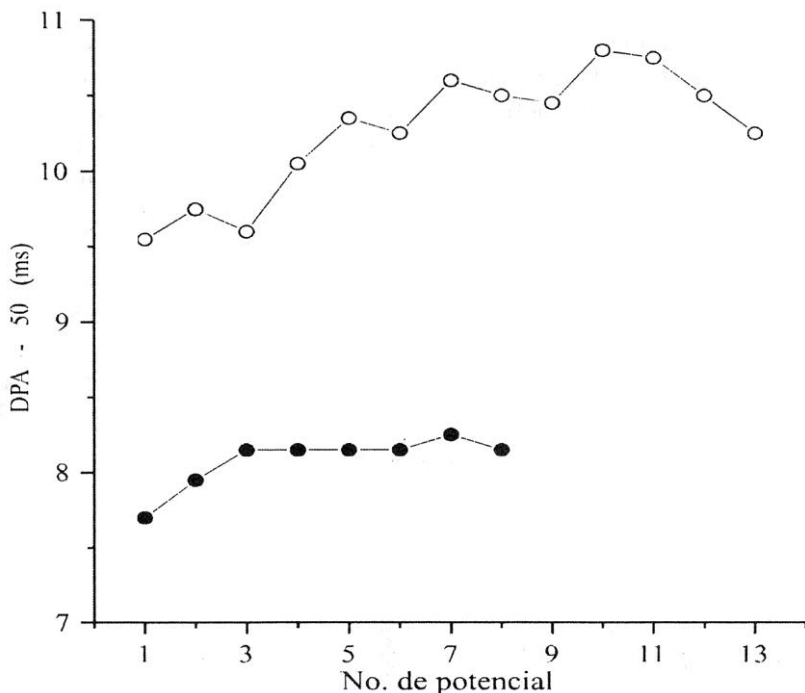
también aumentan y, al retirar el TEA de la solución externa que baña la preparación, disminuyen recuperándose a valores semejantes a las condiciones control. El periodo entre ráfaga y ráfaga también es modificado por la aplicación de TEA. El periodo entre ráfagas disminuye, por lo que la frecuencia de descarga de ráfagas aumenta. Este incremento es del 6%, y se recupera a valores semejantes al control cuando se lava el TEA de la solución externa.

Figura 5



Cambios de la actividad eléctrica inducidos por el tetraetilamonio. Registros del potencial de membrana en dos escalas de tiempo diferentes, en condiciones control (A) y en presencia de 1 mM de TEA (B). C, registros superpuestos del primer potencial de acción de cada ráfaga en condiciones control (C) y con TEA.

Figura 6



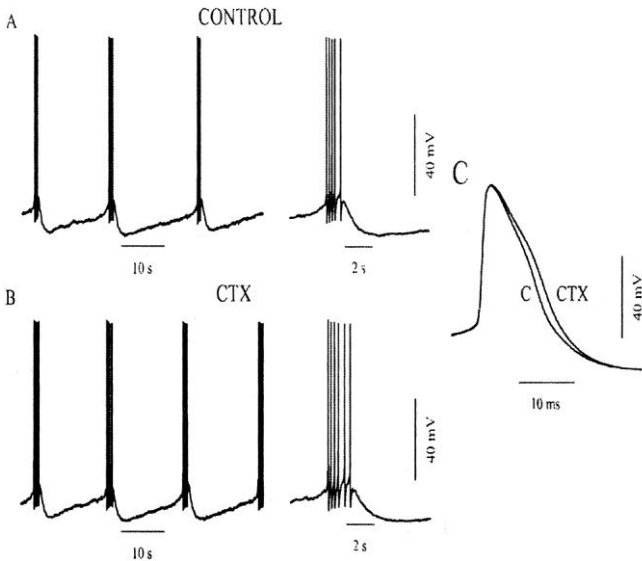
Efecto del tetraetilamonio sobre la duración de los potenciales de acción. Duración de potencial de acción medida al 50% de la amplitud (DPA-50) en función del número de espiga durante una ráfaga en condiciones control (●) y después de agregar el 1 mM de TEA (○).

Los efectos producidos por la aplicación de CTX, bloqueador específico de los canales maxi-K, se observan en las **figuras 7 y 8**. En la **figura 7** se muestran los registros en dos escalas de tiempo diferentes, en condiciones control (**figura 7A**) y al agregar 100 nM de CTX (**figura 7B**). En la **figura 7C** se muestran registros típicos del primer potencial de acción de una ráfaga en condiciones control y en presencia de 100 nM de CTX. La CTX tuvo mayor efecto sobre la duración de la ráfaga que sobre la duración del potencial de acción, aumentando 31% y 10% (n=5), respectivamente (**tabla 3**). La duración aumenta en todos los potenciales de acción de la ráfaga, como puede observarse en la **figura 8**. El periodo entre ráfagas también es modificado por la aplicación de la CTX, incrementándose la frecuencia de descarga de ráfagas

en un 8.6%. Todos los efectos sobre la actividad eléctrica observados durante la aplicación de CTX son reversibles. La duración del potencial de acción, el número de espigas por ráfaga y la frecuencia de descarga se recuperan a valores semejantes a las condiciones control cuando la CTX es lavada del medio extracelular con la solución control_FC.

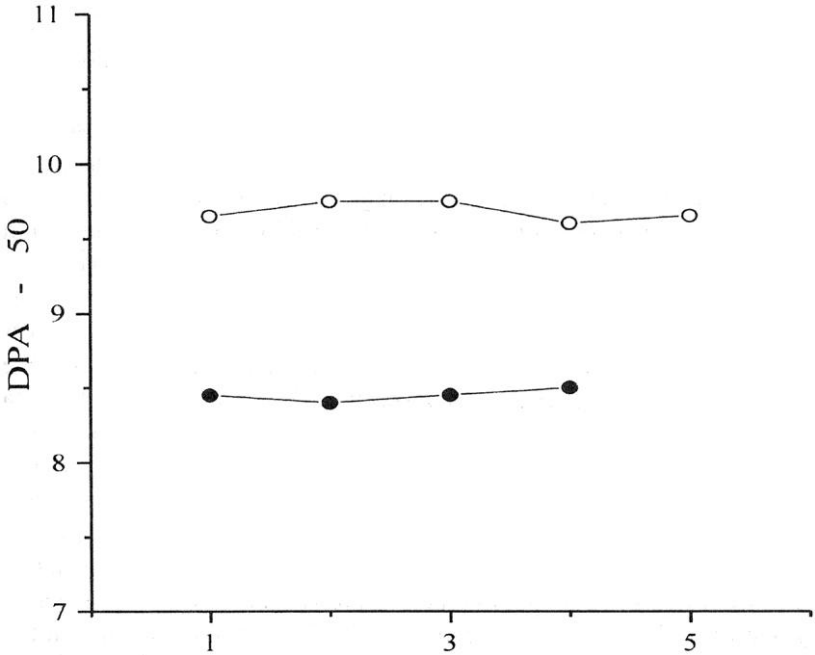
Los efectos sobre la frecuencia y el número de espigas por ráfaga, producidos durante la aplicación de CTX, son semejantes a los producidos por la aplicación de TEA, pero el incremento en la duración observado con la CTX fue menor al observado cuando se aplicó el TEA (10% y 25%, respectivamente). Estos efectos observados con TEA y CTX sugieren que los canales maxi-K participan en la actividad eléctrica de las neuronas del OX determinando la duración de las ráfagas y de los potenciales de acción. La participación de estos canales en la frecuencia de ráfagas fue menor que en la duración de las ráfagas y de los potenciales de acción.

Figura 7



Cambios de la actividad eléctrica producidos por la caribdotoxina. Registros del potencial de membrana en dos escalas de tiempo diferentes, en condiciones control (A) y en presencia de 100 nM de CTX (B). C, registros superpuestos del primer potencial de acción de cada ráfaga en condiciones control (C) y con CTX.

Figura 8



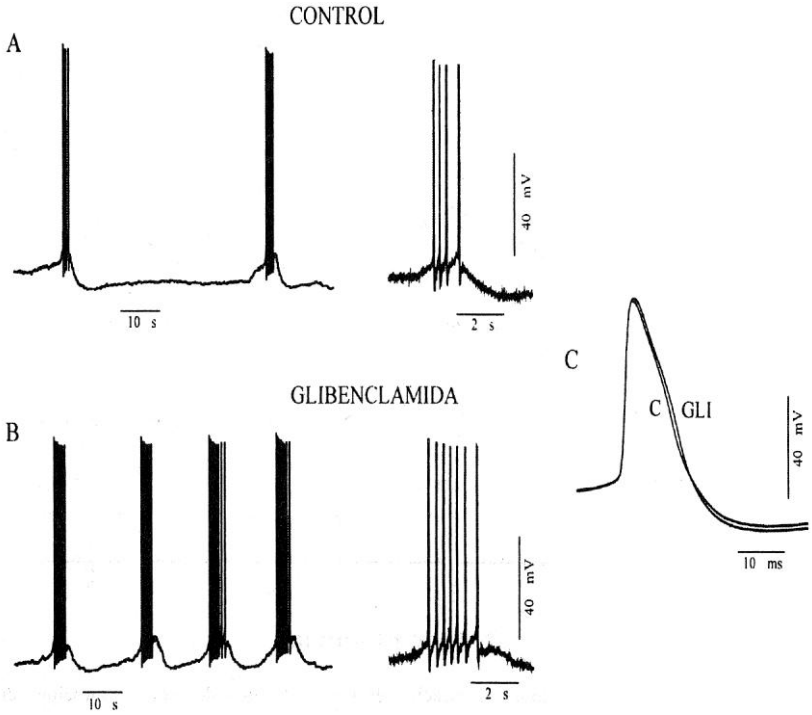
Efecto de la caribdotoxina sobre la duración de los potenciales de acción. Duración del potencial de acción medida al 50% de la amplitud (DPA-50) en función del número de espiga durante una ráfaga en condiciones control (●) y después de agregar 100nM de CTX (○).

Participación de los canales de potasio sensibles a ATP sobre la actividad eléctrica de las neuronas que descargan en ráfagas

La participación de los canales de potasio sensibles a ATP en las células con actividad eléctrica en ráfagas fue estudiada utilizando glibenclamida (GLI) como bloqueador específico para estos canales. Los efectos de la aplicación de GLI se observan en las **figuras 9 y 10**. En la **figura 9** se muestran los registros en dos escalas de tiempo dife-

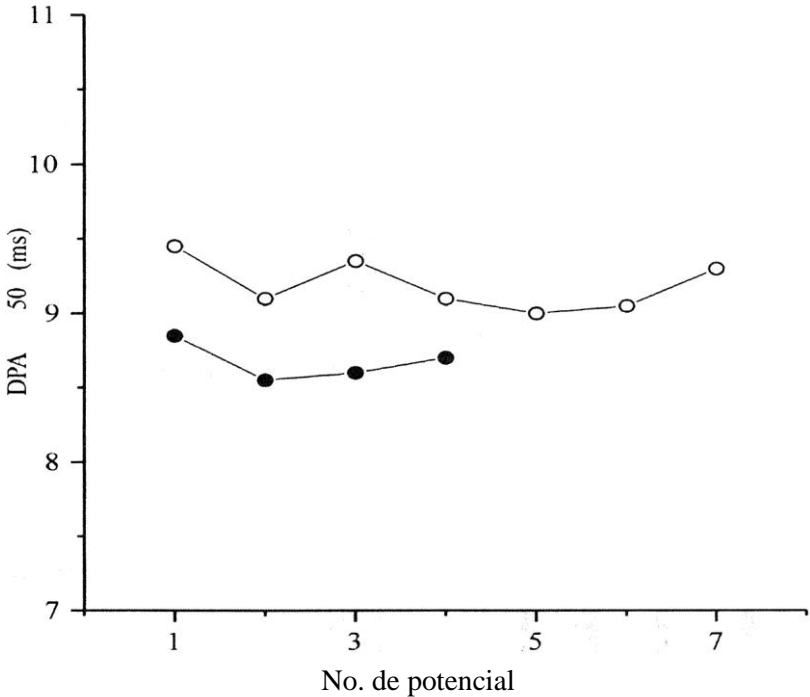
rentes en condiciones control (**figura 9A**), y al agregar 50 μM de GLI (**figura 9B**). En la **figura 9C** se muestran registros típicos del primer potencial de acción de una ráfaga en condiciones control y en presencia de GLI. El mayor efecto de la GLI fue sobre la frecuencia de ráfagas y la duración de la ráfaga, aumentando 110% y 55% ($n=5$), respectivamente (**tabla 3**). La frecuencia de descarga de ráfagas se duplicó respecto al control, con incrementos hasta del 125%; aunque menor, el efecto sobre la duración de la ráfaga también fue importante, observándose un incremento hasta del 65%. La duración del potencial de acción también se modifica con la aplicación de GLI, aumentando un 5.7%. El incremento en la duración se observa en todos los potenciales de acción de la ráfaga, como se muestra en la **figura 10**. Estos resultados sugieren que los canales K_{ATP} participan en la actividad eléctrica de las neuronas del OX determinando la frecuencia y duración de las ráfagas. La participación de estos canales en la duración del potencial de acción fue menor que en la frecuencia y la duración de las ráfagas. El efecto de la aplicación de GLI no se observó tan rápido como durante la aplicación de TEA o CTX, debido posiblemente a que la GLI debe difundir al medio intracelular para bloquear a los canales K_{ATP} por su cara citoplásmica. Esto puede explicar por qué no se observó una recuperación total al lavar la GLI del medio extracelular con la solución salina control_FC. Sin embargo, el efecto sobre la duración del potencial de acción fue siempre reversible al retirar la GLI del medio extracelular, mientras que el efecto sobre el número de espigas por ráfaga y la frecuencia fue parcialmente reversible.

Figura 9



Cambios de la actividad eléctrica producidos por la glibenclamida. Registros del potencial de membrana en dos escalas de tiempo diferentes, en condiciones control (A) y en presencia de 50 μ M de GLI (B). C, registros superpuestos del primer potencial de acción de cada ráfaga en condiciones control (C) y con GLI.

Figura 10



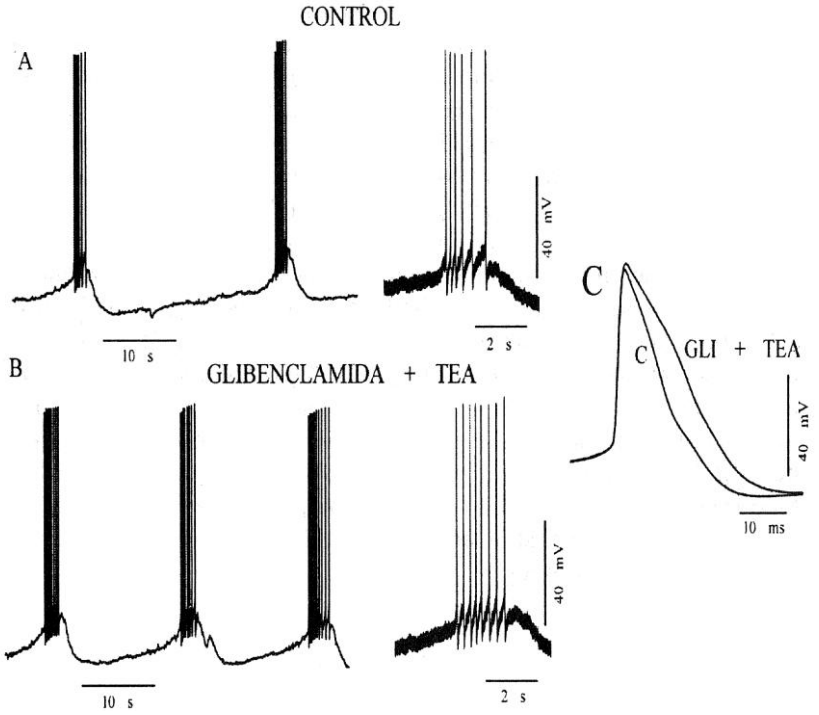
Efecto de la glibenclamida sobre la duración de los potenciales de acción. Duración del potencial de acción medida al 50% de la amplitud (DPA-50) en función del número de espiga durante una ráfaga en condiciones control (●) y después de agregar 50 μM de GLI (○).

Efectos sobre la actividad electrofisiológica al bloquear los canales de potasio activados por calcio y los sensibles a ATP

La participación combinada de los canales maxi-K y K_{ATP} en las células con actividad eléctrica en ráfagas fue estudiada utilizando los bloqueadores para cada canal (TEA y GLI) en la solución externa control_FC, a las concentraciones ya mencionadas. Los efectos de la aplicación simultánea de GLI y TEA se observan en las **figuras 11 y 12**. En la **figura 11** se muestran los registros en dos escalas de tiempo diferentes, en condiciones control (**figura 11A**) y al agregar 50 μM de

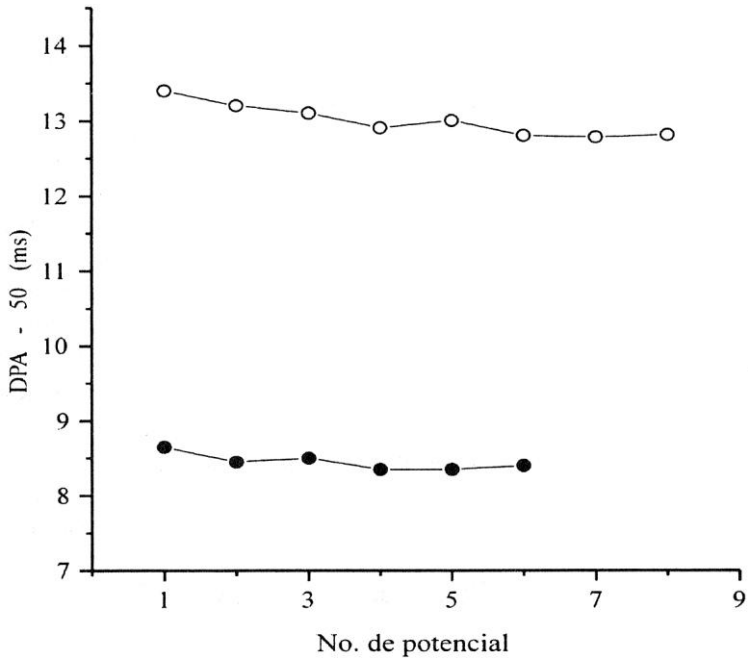
GLI y 1 mM de TEA (**figura 11B**). En la **figura 11C** se muestran registros típicos del primer potencial de acción de una ráfaga en condiciones control y en presencia de 50 μ M de GLI y 1 mM de TEA. La aplicación simultánea de los bloqueadores GLI y TEA afectó significativamente la duración del potencial de acción, la frecuencia y el número de potenciales de acción por ráfaga. La duración del potencial de acción y la frecuencia de ráfagas aumentaron 52% mientras que el número de espigas por ráfaga aumentaron 33% (**tabla 3**). El efecto sobre la duración del potencial de acción se potenció con la mezcla de bloqueadores, ya que el incremento fue mayor a la suma de los incrementos observados durante la aplicación de cada bloqueador. El incremento sobre el número de espigas fue semejante al observado durante la aplicación de TEA o CTX, pero menor al observado durante la aplicación de GLI; mientras que el incremento sobre la frecuencia de ráfagas fue mayor al observado durante la aplicación de TEA o CTX, pero menor al observado durante la aplicación de GLI. Como se mencionó antes, para la aplicación de GLI sola, los efectos observados durante la aplicación de los bloqueadores GLI y TEA no fueron completamente reversibles. La recuperación no fue total al lavar la mezcla GLI-TEA del medio externo con la solución control_FC.

Figura 11



Cambios de la actividad eléctrica producidos por la glibenclamida y el tetraetilamonio. Registros del potencial de membrana en dos escalas de tiempo diferentes, en condiciones control (A) y en presencia de 1mM de TEA y 50 μ M de GLI (B). C, registros superpuestos del primer potencial de acción de cada ráfaga en condiciones control (C) y con GLI+TEA.

Figura 12



Efecto de la glibenclamida y el tetraetilamonio sobre la duración de los potenciales de acción. Duración del potencial de acción medida al 50% de la amplitud (DPA-50) en función del número de espigas durante una ráfaga en condiciones control (●) y después de agregar 50 μM de GLI y 1 mM de TEA (○).

El efecto ejercido por cada bloqueador sobre la frecuencia, el número de espigas por ráfaga y la duración del potencial de acción se muestran en la **tabla 3**, expresados en por ciento del cambio. Los valores corresponden a la media ± error estándar. El valor reportado como incremento en duración del potencial de acción se refiere únicamente al primer potencial de acción de las ráfagas.

Tabla 3 % de incremento (Media ± Es)

	DUR. PA	NO. ESPJRAF.	FREC. RAF.
TEA	24.9 f 1.2	37.5 ± 9	5.7 ± 1.5(n=7)
CTX	10.1 ± 2.1	30.8 ± 12	8.6 ± 2.3(n=5)
GLI	5.7 f 1.0	55.3 ± 10	110 f 15(n=5)
GLI + TEA	52.9 f 5.7	33.3 ± 7	52.2 ± 9(n=3)

2. Contribución de los canales de potasio a la corriente saliente total

Contribución de la corriente de potasio activada por calcio a la corriente saliente total.

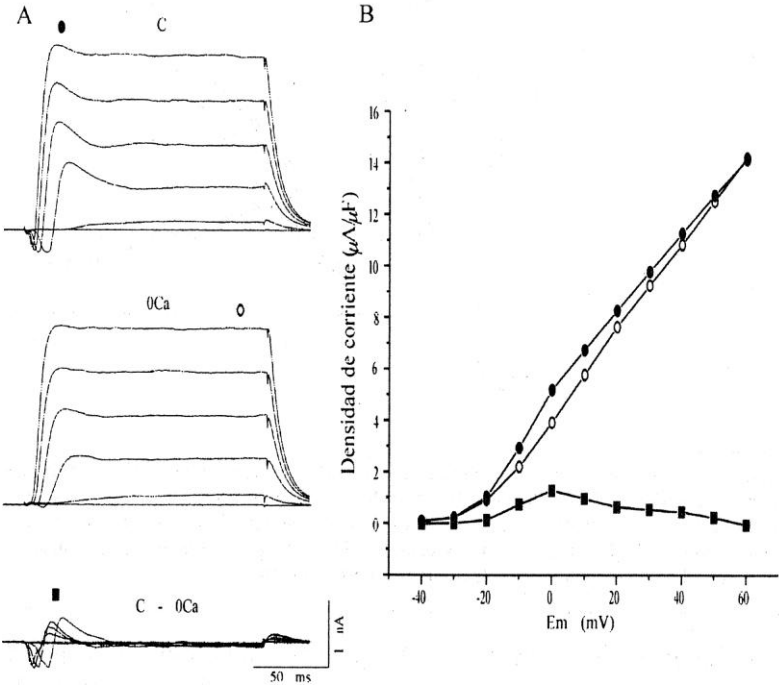
En los registros obtenidos, con la solución FV en las pipetas y con la solución control_FV en el medio extracelular, se diferenciaron al menos tres tipos de corrientes, una entrante de calcio y dos salientes de potasio. Las corrientes de potasio pueden diferenciarse por su curso temporal en un componente transitorio y otro sostenido. El componente transitorio parece depender del potencial de membrana y del influjo de calcio, mientras que el componente sostenido depende sólo del potencial de membrana (**figuras 13 y 14**). Por lo tanto, el estudio de la contribución de la corriente de potasio activada por Ca^{2+} se hizo de dos formas: bloqueando o suprimiendo la corriente de calcio que la activa, y con bloqueadores específicos de los canales maxi-K. Es decir, la corriente maxi-K fue extraída de la corriente saliente total al sustituir el calcio de la solución externa por magnesio o mediante el bloqueo de los canales de Ca^{2+} por Cd^{2+} , o bloqueando los canales maxi-K utilizando TEA o CTX.

Las curvas I-V obtenidas cuando las neuronas fueron perfundidas con la solución control_FV presentan una joroba en el rango de potenciales -30 a + 30 mV (potenciales en los cuales se activa la corriente de calcio), mientras que las obtenidas en las soluciones sin Ca^{2+} , con Cd^{2+} , TEA o CTX no presentan dicha joroba. Por lo tanto, la corriente de potasio activada por el influjo del calcio es la responsable de la joroba en la curva I-V (**figuras 13, 14, 15 y 16**).

Cuando se sustituyó el Ca^{2+} por el Mg^{2+} en la solución externa o cuando se le agregó Cd^{2+} desaparecieron de los registros la corriente entrante y el componente transitorio de la corriente saliente, mientras que el componente sostenido no sufrió cambio significativo (**figuras 13A y 14A**). Para extraer de los registros las corrientes iónicas bloqueadas con estas maniobras experimentales, se restaron digitalmente (punto a punto) los registros obtenidos en las soluciones sin Ca^{2+} o con Cd^{2+} de los registros obtenidos en la solución control_FV. Mediante estas maniobras experimentales se identificaron los tres tipos de corriente observados en los registros obtenidos con la solución control_FV: la corriente entrante (ICa), debida al influjo de iones Ca^{2+} a través de los

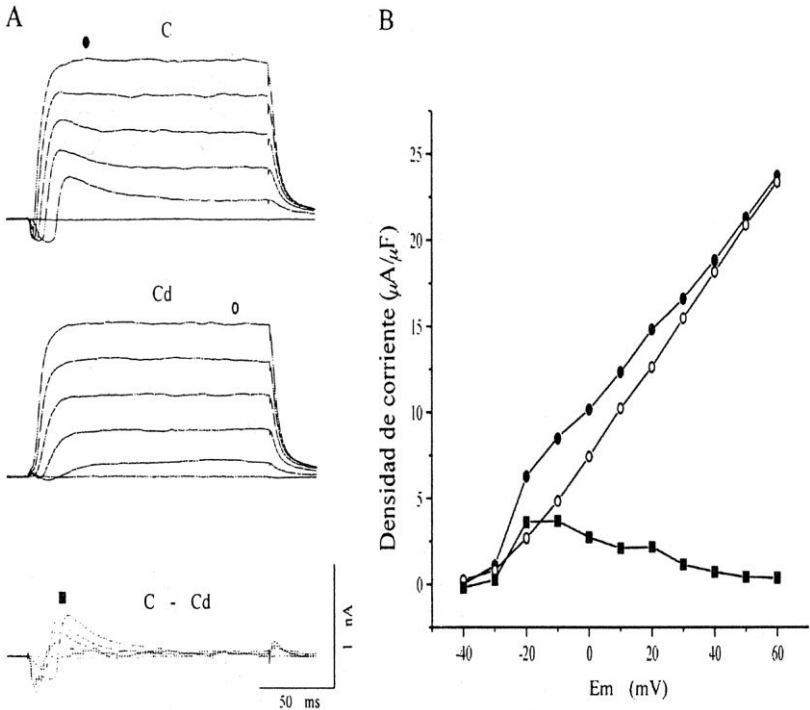
canales de calcio dependientes de voltaje, el componente transitorio de la corriente saliente debido a la salida de iones potasio a través de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} , y el componente sostenido de la corriente de potasio que no es sensible al influjo de Ca^{2+} . Cuando las células se perfunden nuevamente con la solución control_FV, tanto la I_{Ca} como la I_{maxi-K} aparecen en los registros, observándose una recuperación total. En las figuras 13B y 14B se muestran las curvas I-V de las corrientes salientes.

Figura 13.



Bloqueo de la corriente transitoria de potasio al suprimir la corriente de calcio. A, registros de corriente obtenidos en una neurona a potenciales de membrana (Vm) de -40 a +60 mV (con incrementos de 20 mV) a partir de un potencial de mantenimiento (VH) de -50 mV, en solución control_FV (C), en solución sin calcio (0Ca) y la resta digital de los registros sin calcio de los obtenidos en la solución control_FV (C-0Ca). B, curvas I-V de las corrientes salientes obtenidas (midiendo el máximo de corriente en cada caso) en condiciones control (●), al quitar el calcio (○) y la diferencia (resta) entre ellas (■).

Figura 14

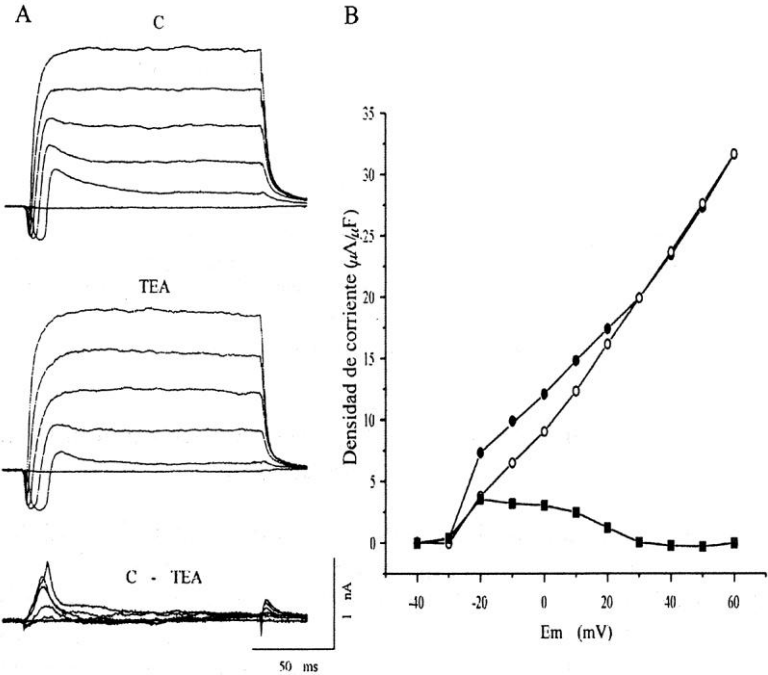


Bloqueo de la corriente transitoria de salida al agregar CdCl₂. A, registros de corriente obtenidos en una neurona ($V_m = -40$ a $+60$ mV, $V_H = -50$ mV) en solución control_FV (C), en solución con 0.4 mM de CdCl₂ (Cd) y la resta de los registros con cadmio de los obtenidos en la solución control_FV (C-Cd). B, curvas 1-V de las corrientes salientes obtenidas ch condiciones control (●), al agregar cadmio (○) y la diferencia entre ellas (■).

Al agregar TEA (1 mM) o CTX (100 nM) en la solución de perfusión, ni la corriente entrante ni el componente sostenido de la corriente saliente sufrieron cambios significativos, mientras que el componente transitorio de la corriente saliente se redujo considerablemente (figuras 15 y 16). Para separar la corriente fónica bloqueada con el TEA o con la CTX se restaron los registros obtenidos en las soluciones con TEA o CTX de los registros obtenidos en la solución control_FV (figura 15A). El registro de corriente obtenido de esta resta es semejante al componente saliente de las restas obtenidas al suprimir la ICa (figuras 13A y 14A). En estas restas de los registros de corriente no aparece la corrien-

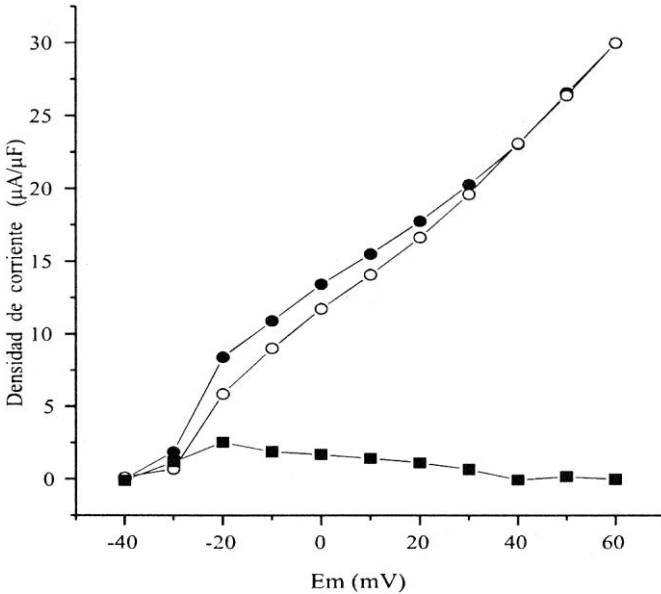
te entrante debido a que se elimina cuando se restan componentes entrantes iguales de los registros en ambas condiciones experimentales (**figura 15A**). Cuando las células se perfunden nuevamente con la solución control FV, el componente transitorio reaparece en los registros. Es decir, el bloqueo de la corriente obtenido al agregar TEA o CTX a la solución externa es completamente reversible cuando son retirados de la misma. Las **figuras 15B** y 16 muestran las curvas I-V obtenidas cuando las neuronas fueron perfundidas con TEA o con CTX. La joroba observada en el rango de potenciales -30 a $+30$ mV con la solución control_FV desaparece cuando se agrega TEA o CTX. Estas curvas I-V son semejantes a las que se muestran en las **figuras 13B** y **14B**.

Figura 15



Bloqueo de la corriente transitoria de salida con tetraetilamonio. A, registros de corriente obtenidos en una neurona ($V_m = -40$ a $+60$ mV, $V_H = -50$ mV) en solución control_FV (C), en solución con 1 mM de TEA (TEA) y la resta de los registros con TEA de los obtenidos en la solución control_FV (C-TEA). B, curvas I-V de las corrientes salientes obtenidas en condiciones control (●), al agregar TEA (○) y la diferencia entre ellas (■).

Figura 16



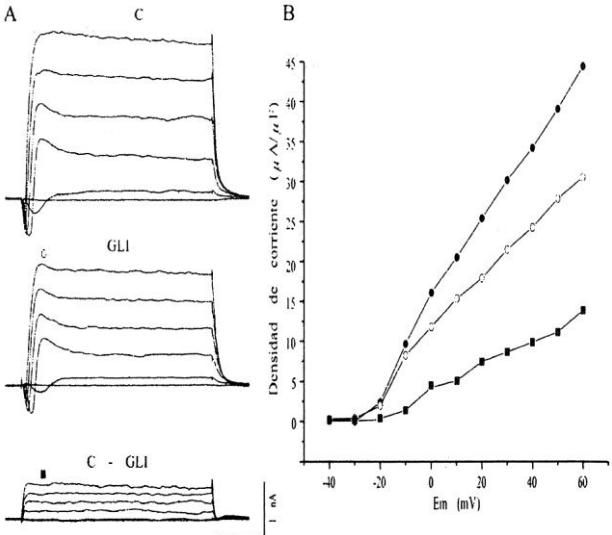
Bloqueo de la corriente transitoria de salida con caribdotoxina. Curvas I-V de los registros de corriente obtenidos en una neurona ($V_m = -40$ a $+60$ mV, $V_H = -50$ mV) en solución control_FV (●), al agregar 100 nM de CTX (○) y la resta de los registros con CTX de los obtenidos en la solución control_FV (■).

Contribución de la corriente de potasio sensible a ATP a la corriente saliente total

El estudio de la contribución de la corriente de potasio sensible a ATP se hizo bloqueando específicamente los canales K_{ATP} con glibenclamida. En la **figura 17** se muestra el efecto de la GLI sobre las corrientes registradas en una neurona del OX. Debido a la especificidad de la GLI por los canales K_{ATP} , ni la corriente entrante ni el componente transitorio de la corriente saliente sufrieron cambios significativos, mientras que el componente sostenido de la corriente saliente se redujo considerablemente (**figura 17A**). Para separar la corriente bloqueada por la GLI se restaron los registros obtenidos en la solución con GLI de los registros obtenidos en la solución control FV (**figura 17A**). El registro de corriente obtenido de esta resta difiere de las restas mostradas en las

figuras 13, 14 y 15. En esta resta de los registros de corriente no aparece ni la corriente entrante ni el componente transitorio de la corriente saliente debido a que se eliminan durante la resta. Cuando las células se perfundieron nuevamente con la solución control_FV, la recuperación de la IK_{ATP} fue parcial, pero significativa. Por esta razón, la preparación que era perfundida con GLI, tanto en fijación de corriente como en fijación de voltaje se desechaba al terminar el experimento. La curva I-V obtenida cuando las neuronas fueron perfundidas con la solución control FV, como en todas las condiciones control reportadas, presentó una joroba en el rango de potenciales -30 a +30 mV. Dicha joroba fue más pronunciada en la curva I-V obtenida en presencia de GLI debido a la reducción de las corrientes del componente sostenido que enmascararan a la I_{maxi-K} . La curva I-V de la IK_{ATP} difiere de la curva I-V para la I_{maxi-K} ; mientras que ésta tiene forma de campana, aquella no presenta la joroba (**figura 17B**).

Figura 17



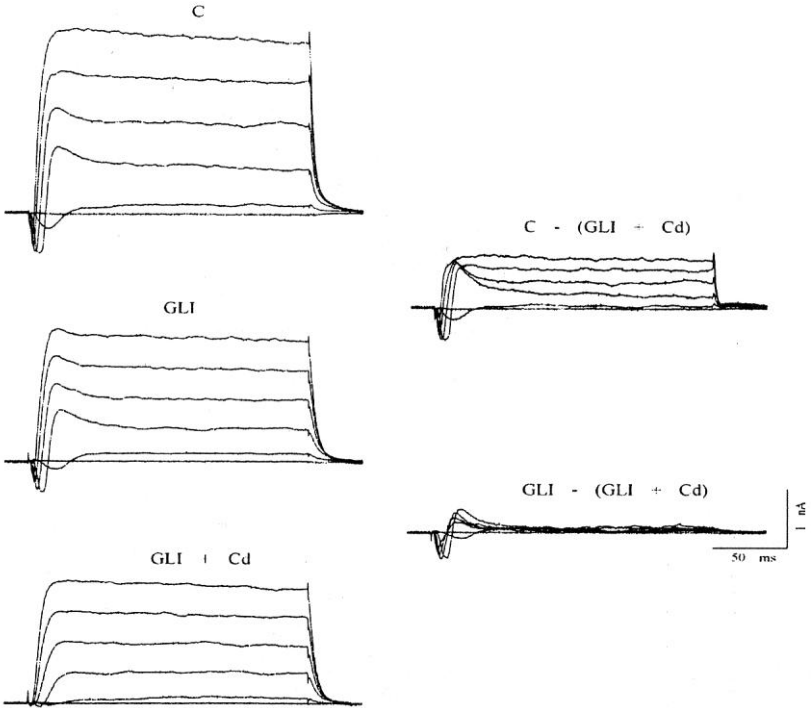
Disminución de la corriente sostenida de salida con glibenclamida. **A**, registros de corriente obtenidos en una neurona ($V_m = -40$ a $+60$ mV, $V_H = -50$ mV) en solución control_FV (C), al agregar 50 μM de glibenclamida (GLI) y la resta de los registros con glibenclamida de los obtenidos en la solución control_FV (C-GLI). **B**, curvas I-V de las corrientes salientes obtenidas en condiciones control (\bullet), al agregar glibenclamida (o) y la diferencia entre ellas (\blacksquare).

La corriente de potasio activada por calcio y la sensible a ATP están presentes en una misma neurona

De las maniobras experimentales posibles para saber si las corrientes $I_{\text{maxi-K}}$ e $I_{\text{K}_{\text{ATP}}}$ están presentes en una misma neurona, primero se bloquearon los canales K_{ATP} con glibenclamida y después los canales maxi-K bloqueando la I_{C_a} con Cd^{2+}

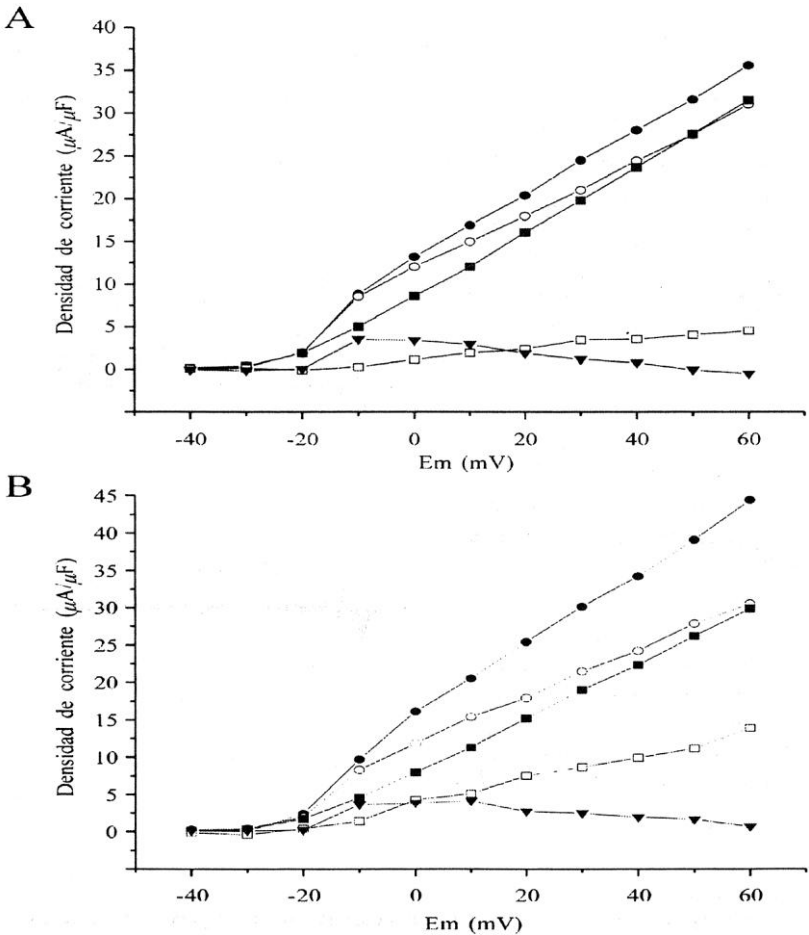
En la **figura 18** se muestran los registros de corriente obtenidos en una misma neurona del OX en la solución control_FV (C), al agregar glibenclamida (GLI) y después de añadir CdCl_2 (GLI + Cd) a la solución de perfusión. Para separar la corriente bloqueada con la glibenclamida o con el cadmio, se restaron los registros obtenidos en la solución con glibenclamida y Cd^{2+} de los registros obtenidos en la solución control_FV (C - (GLI + Cd)), y los registros obtenidos en la solución con glibenclamida y Cd^{2+} de los registros correspondientes obtenidos en glibenclamida sola (GLI - (GLI + Cd)) (**figura 18**). El registro de corriente obtenido de la primer resta contiene tanto el componente transitorio ($I_{\text{maxi-K}}$) como a la corriente $I_{\text{K}_{\text{ATP}}}$; mientras el registro de la segunda resta, semejante a los que se muestran en las **figuras 13A** y **14A**, contiene solamente el componente transitorio de la corriente saliente (además de la I_{C_a}). En la **figura 19** se muestran las curvas I-V obtenidas en dos células diferentes con la misma maniobra experimental. Aunque ambos tipos de canales están presentes en una misma célula, la contribución en la corriente saliente no es la misma en todas las células. La participación de la $I_{\text{K}_{\text{ATP}}}$ es diferente de una célula a otra mientras que la $I_{\text{maxi-K}}$ es semejante en todas las células.

Figura 18



Bloqueo de las corrientes transitoria y sostenida de salida con CdCl_2 y glibenclamida. Registros de corriente obtenidos en una neurona ($V_m = -40$ a $+60$ mV, $V_H -50$ mV) en solución control_FV (C), al agregar $50 \mu\text{M}$ de glibenclamida (GLI), en solución con $50 \mu\text{M}$ de glibenclamida y 0.4 mM de CdCl_2 (GLI + Cd), la resta de los registros con GLI+Cd de los obtenidos en la solución control_FV [$C+(GLI+CD)$], y la resta de los registros con GLI+Cd de los obtenidos en la solución con glibenclamida [$GLI-(GLI+Cd)$].

Figura 19



Bloqueo de las corrientes transitoria y sostenida de salida con CdCl₂ y glibenclamida en dos células diferentes. A y B, curvas 1-V de los registros de corriente obtenidos en dos neuronas distintas ($V_m = -40$ a $+60$ mV, $V_H = -50$ mV) en solución control_FV (●), al agregar 50 μM de glibenclamida (○), en solución con 50 μM de glibenclamida y 0.4 mM de CdCl₂ (■), y la resta de los registros con GLI+Cd de los obtenidos en la solución control FV (□), y la resta de los registros con GLI+Cd de los obtenidos en la solución con glibenclamida (▼).

Discusión

En este trabajo se estudiaron los canales de potasio activados por calcio (maxi-K) y los sensibles a ATP (K_{ATP}) con la técnica de patch-clamp en la configuración de whole-cell, mediante el método del parche perforado con nistatina,²⁰ en los modos de fijación de corriente y fijación de voltaje. En fijación de corriente se registró el potencial de membrana de las neuronas del OX y se estudió la participación de los canales maxi-K y K_{ATP} en la actividad eléctrica de estas células; mientras que en fijación de voltaje se registró la corriente macroscópica y se determinó la contribución de las corrientes fónicas a través de los canales maxi-K y K_{ATP} en la corriente total de la célula.

La mayoría de las neuronas del OX tienen actividad espontánea en ráfagas

Las neuronas del OX son parte de un sistema neurosecretor y su actividad eléctrica está relacionada con su función endocrina. Por lo tanto, la observación de patrones en ráfagas con mayor frecuencia concuerda con la función endocrina de este sistema en el acocil, debido a que este tipo de actividad es el más efectivo para la secreción^{8,31,42}. Sin embargo, debido: 1. A que el acocil presenta cambios mensuales, estacionales o durante el día en procesos regulados hormonalmente como el metabolismo de carbohidratos, la muda o la reproducción; y 2. A que la actividad eléctrica puede depender del estado metabólico del acocil, es posible que el patrón de actividad que predomine en las neuronas del OX no sea el de ráfagas en otras condiciones o periodo de registro. Es decir, la actividad eléctrica que se registre puede depender de la hora del día, del mes o de la estación del año.

La técnica de registro es otro factor que puede afectar la actividad eléctrica de los somas del OX, además de los estados metabólicos o fisiológicos antes mencionados. Las frecuencias de ocurrencia de cada tipo de actividad electrofisiológica, encontradas anteriormente con la técnica convencional de microelectrodos, difieren de las reportadas en este trabajo. En trabajos previos, los porcentajes de actividad eléctrica oscilaron entre 51 y 56% para neuronas silentes, 27 y 35% para tónicas,

y de 9 a 21% para células que descargan en ráfagas.^{1, 32} Aunque el número de neuronas registradas con la técnica del parche perforado que aquí se reportan es menor, la frecuencia de observación de los patrones de descarga encontrados es diferente (20% silentes, 13% tónicas y 67% en ráfagas).

Cada técnica de registro modifica el microambiente intracelular y por consiguiente, afecta la actividad eléctrica de la célula. Sin embargo, el daño celular producido por un microelectrodo es mayor al producido por la pipeta en un whole-cell convencional, y este mayor al producido al usar el parche perforado. Por lo tanto, las diferencias que se observan con cada técnica pueden deberse al daño celular producido o a la naturaleza del sello entre la membrana celular y la pipeta de registro.²⁵

Otra diferencia que puede observarse entre las técnicas de registro con pipetas (whole-cell convencional o parche perforado) respecto a las técnicas con microelectrodos, además del efecto sobre la frecuencia de observación del patrón de descarga, es la amplitud de las señales eléctricas registradas con cada técnica. Estas diferencias pueden explicarse por las resistencias de entrada (R_m) y por las resistencias del sello (R_s) formadas entre la membrana celular y los microelectrodos o las pipetas. Mientras que la R_s usando microelectrodos puede ser de 500 M Ω , al utilizar pipetas puede ser mayor o igual que 20 G Ω . Por lo tanto, el *gigasello* reduce la corriente de fuga que puede afectar la magnitud del potencial registrado, particularmente si la célula es pequeña. Esto puede explicar porqué la participación de la INSR en la actividad eléctrica de las neuronas del OX es menos evidente, con la consiguiente menor frecuencia de observación de descarga en ráfagas, con el registro intracelular que con el parche perforado, debido a que la actividad en ráfagas requiere de una resistencia de membrana efectiva mínima.⁶ Además, mientras que la resistencia de los microelectrodos (R_e) puede ser de 100 M Ω , la de las pipetas es de 3 a 6 M Ω . Los canales de nistatina presentan muy poca difusión lateral desde el sello formado con la pipeta,¹⁹ por lo que la R_e depende de la conductancia y densidad de los canales formados por la nistatina en el área de membrana cubierta por la pipeta. La R_e reducida de las pipetas favorece el flujo de corriente por la pipeta, por lo que pueden registrarse mejor que con microelectrodos las corrientes iónicas generadas en la célula completa. Por lo tanto, los potenciales de acción que se registren con pipetas para *patch* pueden tener mayor amplitud que los registrados con los microelectrodos.

Participación de los canales maxi-K y K_{ATP} en la actividad eléctrica

Los canales maxi-K no participan en el potencial de reposo de las neuronas del OX debido a que a ese potencial los canales están cerrados. Esto explica porqué no se observó ningún cambio en el potencial de reposo con la aplicación del TEA o la CTX. Por el contrario, los canales K_{ATP} están abiertos al potencial de reposo de la célula y participan de manera importante en su mantenimiento,³³ ya que su bloqueo con la glibenclamida despolariza la célula. La participación de ambos tipos de canales en la frecuencia de descarga, el número de espigas por ráfaga y la duración del potencial de acción es semejante, pero cuantitativamente diferente. Los canales maxi-K participan en la duración del potencial de acción y de la ráfaga, mientras que los canales K_{ATP} participan en la duración del periodo entre ráfagas (**tabla 3**). La menor participación de los canales K_{ATP} respecto a los canales maxi-K sobre la duración de los potenciales de acción puede explicarse por la diferente dependencia al voltaje de ambos canales. Debido a que los canales K_{ATP} están abiertos y los canales maxi-K cerrados al potencial de reposo de la célula, la despolarización producida por el potencial de acción tiene menor efecto sobre los canales K_{ATP} que sobre los canales maxi-K, los cuales son además activados por el influjo de calcio inducido por la despolarización. Por lo tanto, la participación de estos últimos en la duración del potencial de acción es mayor. Cuando ambos canales son bloqueados, la actividad eléctrica se modifica de manera importante, aunque la frecuencia y la duración de las ráfagas aumentaron menos que con sólo el bloqueo de los canales K_{ATP} . Esto puede explicarse por la potenciación del efecto de la mezcla glibenclamida+TEA sobre la duración del potencial de acción, cuyo aumento es mayor a la suma del incremento obtenido con cada bloqueador por separado (**tabla 3**). La potenciación del efecto sobre la duración del potencial de acción puede explicarse por la dependencia de los canales maxi-K y K_{ATP} al calcio intracelular. Cuando se bloquea un solo tipo de canal, su efecto sobre la duración es enmascarado por el canal que permanece abierto, y que podría ser activado por el calcio no ocupado por el canal bloqueado. Así, cuando los dos tipos de canales son bloqueados, el incremento en la duración del potencial de acción refleja la participación real de estos canales sobre la actividad eléctrica de las neuronas del OX en actividad en ráfagas.

Contribución de los canales maxi-K y K_{ATP} a la corriente saliente

Los tres tipos de corriente observados en los registros obtenidos en condiciones control, fueron: la corriente entrante (IC_a) debida al influjo de iones Ca^{2+} a través de los canales de calcio dependientes de voltaje, el componente transitorio de la corriente saliente debido a la salida de iones potasio a través de los canales de potasio activados por calcio, y el componente sostenido de la corriente de potasio que no es sensible al influjo de Ca^{2+} . El componente transitorio depende del potencial de membrana y del influjo de calcio, mientras que el componente sostenido depende sólo del potencial de membrana. Las relaciones corriente-voltaje de ambas corrientes son distintas: la curva I-V de la corriente maxi-K tiene forma de joroba en el rango de potenciales -30 a + 30 mV (potenciales en los cuales se activa la corriente de calcio), que refleja su dependencia al voltaje y al influjo de calcio; mientras que la curva I-V de la corriente K_{ATP} es una curva monótonamente creciente debido a que sólo depende del voltaje. En resumen, aunque ambos tipos de canales están expresados en la misma neurona, su contribución en las corrientes salientes no es la misma: los canales maxi-K determinan el componente transitorio de la corriente saliente y la joroba de la curva I-V, mientras que los canales K_{ATP} participan en el componente sostenido y en la pendiente de la curva I-V. Además, la contribución de los canales de potasio activados por calcio y de los sensibles a ATP a la corriente saliente no es la misma para cada célula. Mientras que la contribución del maxi-K parece ser la misma en todas las células, la del K_{ATP} difiere significativamente entre las células. Esta diferencia puede atribuirse al estado metabólico de las células: si en una célula los niveles intracelulares de ATP están elevados, habrá un mayor número de canales K_{ATP} bloqueados, de manera que la contribución de este canal en la corriente saliente total será menor que en una célula con un nivel menor de ATP citosólico. La contribución del maxi-K parece ser semejante en todas las células debido a su dependencia al voltaje y al influjo de calcio por área de membrana, el cual puede ser el mismo en todas las células. El estado metabólico parece tener menor efecto sobre este canal debido a que al potencial de reposo este canal se encuentra cerrado o por su mayor dependencia al voltaje y al influjo de calcio que al nivel de ATP.

Glucosa y glibenclamida, diferente efecto sobre la actividad eléctrica

Los efectos de la glibenclamida y los de la glucosa difieren en un aspecto importante. Mientras que la glucosa requiere del metabolismo intracelular para inducir el cierre de los canales K_{ATP} , la glibenclamida actúa directamente sobre ellos. Por lo tanto, la glibenclamida no puede mimetizar los efectos de la glucosa sobre la actividad eléctrica en las neuronas secretoras del OX debido a que ésta y su metabolismo afectan a otros canales además de los K_{ATP} . Sin embargo, el bloqueo de los canales K_{ATP} con la glibenclamida sugiere que algunos efectos de la glucosa son mediados parcialmente por estos canales, los cuales son sensibles tanto a glucosa como a ATP.³³ El efecto de la glucosa sobre la actividad eléctrica consiste en una despolarización del potencial de reposo, un incremento de la frecuencia de descarga, un incremento en la duración del potencial de acción, y un cambio en el patrón de descarga de ráfagas a potenciales de acción individuales.¹⁶ El bloqueo de los canales K_{ATP} con la glibenclamida también despolariza (resultados no mostrados), incrementa la frecuencia de descarga y la duración del potencial de acción, lo que demuestra la participación de los canales K_{ATP} en algunos de los efectos producidos por la glucosa (**figura 9**). El cambio de patrón de descarga no fue observado con el bloqueo de los canales K_{ATP} con glibenclamida debido posiblemente a que en este efecto están involucrados otros canales además de los K_{ATP} .

Metabolismo de la glucosa y los canales K_{ATP} y maxi-K

La modulación eléctrica en las neuronas del OX por las corrientes que fluyen a través de los canales de potasio K_{ATP} y maxi-K, utiliza mecanismos diferentes que vinculan el metabolismo energético celular con la excitabilidad. El metabolismo de la glucosa también puede afectar a los canales maxi-K, los cuales son activados por el ATP-Mg.²³ El efecto de la glucosa sobre este tipo de canal es opuesto al que ejerce sobre los K_{ATP} : mientras que a éstos los inhibe, a los maxi-K los activa. Este efecto antagónico de la glucosa sobre los canales de potasio estudiados puede explicar en parte el cambio de patrón de descarga observado con la glucosa. Los canales maxi-K, activados por el influjo de calcio durante la ráfaga o durante la despolarización producida por el bloqueo de los canales K_{ATP} , pueden participar en la duración de la ráfaga. Además, la sobreactivación de los canales maxi-K por el incremen-

to del ATP citosólico, debido al metabolismo de la glucosa, puede ser suficiente para cambiar la descarga en ráfagas por potenciales de acción simples en estas neuronas. Aunque la participación de estos dos tipos de canales puede explicar parcialmente el cambio de patrón de descarga observado con la glucosa, es necesario incluir a la INSR que se ha descrito en las neuronas del OX con actividad en ráfagas.³² En resumen, al potencial de reposo de las neuronas del OX los canales K_{ATP} están abiertos mientras que los canales maxi-K están cerrados. Cuando el ATP producido durante el metabolismo de la glucosa cierra a los canales K_{ATP} , la resistencia de entrada de la célula aumenta, por lo que la INSR^{32, 41} tiene más efecto sobre el potencial de membrana y aumenta la frecuencia de las ráfagas (**figura 9**). La entrada de calcio por este aumento de actividad y por la despolarización producida al bloquear los K_{ATP} es mayor, por lo que los maxi-K se activan y la resistencia de entrada de la célula disminuye, la INSR tiene menor efecto sobre el potencial de membrana y la actividad de ráfagas desaparece. Esto explica la dependencia al voltaje de la actividad en ráfagas, ya que a potenciales despolarizados no hay descarga en ráfagas.⁶

Conclusiones

Participación de los canales maxi-K y K_{ATP} en la actividad eléctrica

1. Las neuronas del OX presentan diferentes tipos de actividad eléctrica: silente, tónica y en ráfagas. Este último (el más efectivo para la secreción de hormonas) fue el patrón encontrado con mayor frecuencia.

2. En las neuronas del OX con actividad en ráfagas:

A). La presencia de CTX y glibenclamida en el medio extracelular modifican su actividad eléctrica, lo que demuestra la participación de los canales maxi-K y K_{ATP} en estas células.

B). El TEA y la CTX tienen efectos similares sobre el incremento de la frecuencia y el número de espigas por ráfaga, sugiriendo un bloqueo sobre el mismo tipo de canales de potasio.

C). La glibenclamida tiene mayor efecto sobre la frecuencia que sobre el número de espigas por ráfaga, y un efecto mínimo sobre la duración del potencial de acción.

En resumen, en las neuronas que descargan ráfagas, los canales maxi-K participan principalmente en la duración de las ráfagas; mientras que los canales K_{ATP} participan en el potencial de reposo y por lo tanto en la duración del intervalo entre ráfagas.

Contribución de los canales maxi-K y K_{ATP} en la corriente saliente total

1. En los registros de fijación de voltaje, al sustituir Ca^{2+} por Mg^{2+} , agregar Cd^{2+} , TEA o CTX se bloquea una parte de la corriente de potasio. Esto sugiere que esa componente de la corriente saliente es acarreada por iones de potasio a través de los canales maxi-K.

2. La corriente de potasio a través de los canales maxi-K se presenta en el rango de potencial de -30 a + 30 mV, que corresponde al rango de activación de la corriente de calcio previamente estudiada en esta preparación.

3. La corriente de potasio a través de los canales K_{ATP} es dependen-

te de voltaje en el rango estudiado de -40 a + 60 mV.

4. En una misma neurona del OX pueden estar expresados tanto los canales maxi-K como los K_{ATP} , pero no en la misma proporción para todas las neuronas. La participación de la corriente IK_{ATP} es diferente de una célula a otra, mientras que la I_{maxi-K} es semejante en todas las células.

5. La fracción de la corriente de potasio bloqueada por Cd^{2+} , estén o no bloqueados los canales K_{ATP} , es la misma. Por lo tanto, ambos canales son distintos e independientes uno del otro.

En resumen, la corriente total de potasio en los sonsas neuronales está formada por lo menos por 3 componentes: una corriente transitoria activada por calcio (I_{maxi-K}) y dos corrientes sostenidas, una parte debida al paso de iones potasio a través de los canales K_{ATP} (IK_{ATP}), y el resto a través del rectificador tardío (I_K).

Bibliografía

- ¹Acevedo JJ (1996). *Modulación de la actividad electrofisiológicas de neuronas secretoras de acocil por metabolitos de la glucosa*. Tesis para obtener el título de QFB. FCQ, UdeC.
- ²Adams WB, and Benson JA (1985). *the generation and modulation of endogenous rhythmicity the Aplysia bursting pacemaker neurone R15*. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 46: 1-49.
- ³Andrew RD, and Saleuddin ASM (1978). *Structure and innervation of a crustacean neurosecretory cell*. *Can. J. Zoos.* 56: 423-430.
- ⁴Ashcroft FM, Harrison DL, and Ashcroft St (1984). *Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic cells*. *Nature* 312: 446-448.
- ⁵Ashtbrd MLJ, Boden PR, and Treherne J M (1990). *Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels*. *Pflugers Arch.* 415: 479-483.
- ⁶Barker JL, and Gainer H (1975). *Studies on bursting pacemaker potential activity in molluscan neurons. I. Membrane properties and ionic contributions*. *Brain Res.* 84: 461-477.
- ⁷Bolander FF (1989). *Molecular Endocrinology*. Academic Press, Inc. San Diego, CA. 318 pp.
- ⁸Cazalis M, Dayanithi G, and Nordmann JJ (1985). *The role of patterned burst and interburst interval on the excitation-coupling mechanism in the isolated rat neural lobe*. *J. Physiol. Lond.* 395:45-60.
- ⁹Cooke DL, and Hales CN (1984). *Intracellular. I TP directly blocks K⁺ channels in pancreatic cells*. *Nature* 311: 271-273.
- ¹⁰Cooke IM (1977). *Electrical activity of neurosecretory terminals and control of peptide hormone release*. Pages 345-374 in: Gainer H (ed.). *Peptides in Neurobiology*. Plenum Press, New York.
- ¹¹De Kleijn DPV, Coenen T, Laverdure AM, Tensen CP, and Van Herp F (1992). *Localization of messenger RNAs encoding crustacean hyperglycemic hormone and gonad inhibiting hormone in the X-organ sinus gland complex of the lobster Homarus americanus*. *Neuroscience.* 51(1):121-128.
- ¹²Douglas WW, and Rubin RP (1963). *The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling*. *J. Physiol (Lond)* 167:288-310
- ¹³Falke LC, Gillis KD, Pressel DM, and Misler S (1989). *Perforated patch recording allows long-term monitoring of metabolite-induced electrical activity and voltage-dependent Ca²⁺ currents in pancreatic islet B cells*. *FEBS Letter* 251:167-172.

- ¹⁴Fingerman M, and Nagabhushanarn R (1992). *Control of the release of crustacean hormones by neuroregulators*. Comp. Biochem. Physiol. 102C(3): 343-352.
- ¹⁵Gainer H (1972). *Electrophysiological behavior of an endogenously active neurosecretory cell*. Brain Res. 39: 403-418.
- ¹⁶García E, Benítez A, and Onetti CG (1993). *Responsiveness to D-glucose in neurosecretory cells of crustaceans*. J. Neurophysiol. 70(2): 758-764.
- ¹⁷Gorgels-Kallen JL (1985). *Appearance and innervation of CHH-producing cells in the eyestalk of the crayfish Astacus leptodactylus examined after tracing with lucifer yellow*. Cell and Tissue Research 240: 385-391.
- ¹⁸Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, and Sigworth F (1981). *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell free membrane patches*. Pflugers Arch. 391: 85-100.
- ¹⁹Horn R (1991). *Diffusion of nystatin in plasma membrane is inhibited by a glass-membrane seal*. Biophys J. 60: 329-333.
- ²⁰Horn R, and Marty A (1988). *Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method*. J Gen Physiol 92: 145-159.
- ²¹Kadekaro M, Timo-laria C, and Vicentini MLM (1980). *Gastric secretion provoked by functional cytoglucopenia in the nuclei of the solitary tract in the cat*. J. Physiol. (Lond.) 299: 397-407.
- ²²Korn SJ, and Horn R (1989). *Influence of sodium-calcium exchange on calcium current rundown and the duration of calcium-dependent chloride currents in pituitary cells, studied with whole cell and perforated patch recording*. J. Gen. Physiol. 94: 789-812.
- ²³Lara J y Onetti CG (1997). *Descripción de los canales de potasio activados por calcio y Mg-ATP en neuronas secretoras*. Resumen 010. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.
- ²⁴Lemos JR, Nordmann JJ, Cooke IM, and Stuenkel EL (1986). *Single channels and ionic currents in peptidergic nerve terminals*. Nature 319: 410-412.
- ²⁵Marty A, and Neher E (1983). "Tight-seal whole-cell recording". In: Sakmann B, and Neher E (ed) Single-channel recording. Plenum press, New York, pp 107-122.
- ²⁶Minami T, Oomura Y, and Sugimori M (1986). *Electrophysiological responsiveness of guinea-pig ventromedial hypothalamic neurones in vitro*. J. Physiol. 380: 127-143.
- ²⁷Mizuno Y, and Oomura Y (1984). *Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of the rat: in vitro study*. Brain Res. 307: 109-116.
- ²⁸Morris JF, Nordman JJ, and Shaw FP (1981). "Granules, vesicles, and vacuoles their roles in the functional compartments of the neura lobe". In: Neurosecretion. Plenum, press New York.
- ²⁹Newcomb R, Stuenkel E, and Cooke I (1985). *Characterization, biosynthesis, and release of neuropeptides from the X-organ-sinus gland system of the crab, Cardisoma carnifex*. Amer. Zool. 25: 157-171.
- ³⁰Nordman JJ (1983). "Stimulus-secretion coupling". In: Cross BA, Leng G

- (eds). *The neurohypophysis: structure, function and control*. Elsevier, Amsterdam, pp 281-304 (Progres in Brain Research, vol 60).
- ³¹Nordmann JJ, and Raji A (1990). *The mechanism of neurosecretion: Lessons from the sinus gland and from the neurohypofysis*. Ver. dtsh. Zool. Ges. 83: 329-337.
- ³²Onetti CG, García U, Valdiosera F, and Aréchiga H (1990). *Ionic currents in crustacean neurosecretory cells*. J. Neurophysiol. 64: 1514-1526.
- ³³Onetti CG, Lara J, and García E (1996). *Adenine nucleotides and intracellular Ca^{2+} regulate a voltage-dependent and glucose-sensitive potassium channel in neurosecretory cells*. Pflügers Arch. 432: 144-154.
- ³⁴Oomura Y., Ooyama H., Sugimori M., Nakamura T., and Yamada Y. (1974). *Glucose inhibition of the glucose-sensitive neurone in the rat lateral hypothalamus*. Nature (Lond.) 247: 284-286.
- ³⁵Oomura Y, Ohta M, Ishibashi S, Kita H, Okajima T, and Ono T (1978). "Activity of chemosensitive neurons related to the neurophysiological mechanism of feeding". In G. Bray (Ed.) *Recent Advances in Obesity Research*, Vol. 2, Neuman Publishing, London, pp. 17-28.
- ³⁶Penner R, and Neher E (1988). *The role of calcium in stimulus secretion coupling in excitable and non excitable cells*. J. exp. Biol. 139: 329-345.
- ³⁷Ritter RC, Slusser PG, and Stone S (1981). *Glucoreceptorscontrollingfeeding and blood glucose: location in the hind-brain*. Science 213: 451-453.
- ³⁸Saller CF, and Chiodo LA (1980). *Glucose suppresses basal firing and haloperidol-induced increases in the firing rate of central dopaminergic neurons*. Science 210: 1269-1271.
- ³⁹Santos EA, and Keller R (1993). *Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycemic hormone: evidence for a dual feedback control system*. J. Comp. Physiol. B 163: 374-379.
- ⁴⁰Santos EA, and Keller R (1993). *Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of the carbohydrate metabolism: current perspectives*. Comp. Biochem. Physiol. 106A(3): 405-411.
- ⁴¹Smith TG, Barker JL, and Gainer H (1975). *Requirements for bursting pacemaker potential activity in molluscan neurones*. Nature 253: 450-452.
- ⁴²Stuenkel EL (1985). *Simultaneous monitoring of electrical and secretory activity in peptidergic neurosecretory terminals of the crab*. J. Physiol. 359: 163-187.

Índice de figuras y tablas

<i>Figura 1</i>	
Actividad eléctrica y secreción de hormonas en el sistema hipotálamo-neurohipófisis de mamíferos: liberación de vasopresina inducida por la estimulación del lóbulo neural aislado.....	14
<i>Figura 2</i>	
Localización del sistema órgano X-glándula sinusal en el acocil	20
<i>Figura 3</i>	
Esquema del dispositivo experimental.....	21
<i>Figura 4</i>	
Diferentes patrones de actividad eléctrica en las neuronas del OX.....	26
<i>Figura 5</i>	
Cambios de la actividad eléctrica inducida por el tetraetilamonio	28
<i>Figura 6</i>	
Efecto del tetratilamonio sobre la duración de los potenciales de acción.....	29
<i>Figura 7</i>	
Cambios de la actividad eléctrica producidos por la caribdotoxina	30
<i>Figura 8</i>	
Efecto de la caribdotoxina sobre la duración de los potenciales de acción	31
<i>Figura 9</i>	
Cambios de la actividad eléctrica producidos por la glihenclamida	33
<i>Figura 10</i>	
Efecto de la glibenclamida sobre la duración de los potenciales de acción	34
<i>Figura 11</i>	
Cambios de la actividad eléctrica producidos por la glihenclamida y el tetraetilamonio	36
<i>Figura 12</i>	
Efecto de la glibenclamida y el tetraetilamonio sobre la duración de los potenciales de acción	37
<i>Figura 13</i>	
Bloqueo de la corriente transitoria de potasio al suprimir la corriente de calcio..	39

Figura 14
Bloqueo de la corriente transitoria de salida al agregar CdCl₂.....40

Figura 15
Bloqueo de la corriente transitoria de salida con tetractilamonio41

Figura 16
Bloqueo de la corriente transitoria de salida con caribdotoxina.....42

Figura 17
Disminución de la corriente sostenida de salida con glihenclamida43

Figura 18
Bloqueo de las corrientes transitoria y sostenida de salida con CdCl₂ y
glibenclamida45

Figura 19
Bloqueo de las corrientes transitoria y sostenida de salida con CdCl₂ y
glibenclamida en dos células diferentes.....46

Tabla 1
Composición de las soluciones (en mM)20

Tabla 2
% actividad eléctrica (Media ± Es).....27

Tabla 3
% de incremento37

CANALES DE POTASIO
(MAXI-K y K_{ATP})
EN LA ACTIVIDAD
ELÉCTRICA NEURONAL

de Juan José Acevedo Fernández
se terminó de imprimir en julio de 2001
en la Dirección General de Publicaciones
de la Universidad de Colima
Colima, México.

Canales de potasio (maxi-K y K_{ATP}) en la actividad eléctrica neuronal

En este trabajo se estudia la participación de los canales de potasio activados por calcio y la de los sensibles a ATP en la actividad eléctrica de las neuronas secretoras del acocil *Procambarus clarkii* (crustáceo decápodo). Se describe y discute la participación de cada canal en el potencial de membrana, así como su contribución relativa en la corriente saliente total.

Los registros del potencial de membrana y de la corriente total de la célula fueron obtenidos mediante la técnica de parche perforado con nistatina en dos modos de registro: fijación de corriente y fijación de voltaje, respectivamente.

Nota del autor

Originario de Tecomán, Colima, México. Químico farmacéutico biólogo por la Universidad de Colima. Maestro en ciencias, especialidad en fisiología por el Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Colima. Actualmente realiza el proceso de titulación para obtener el grado de doctor en ciencias, especialidad en fisiología en el mismo centro.

