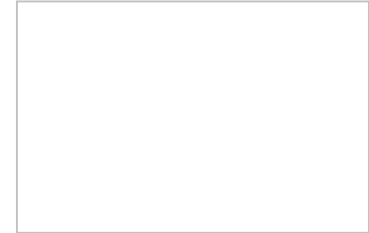


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ**  
 COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
 INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

**INFORME TÉCNICO DE INVESTIGACIÓN DE LA FASE**



(Para uso interno de la CIP únicamente)  
 Sello de recibo con fecha y firma de quien recibe

Ciudad Juárez, Chihuahua a 22 de Junio de 2018

|  |  |
|--|--|
| <b>Periodo que cubre el informe:</b> (dd/mm/aa): | De <u>15 / 08 / 2016</u> a <u>15 / 08 / 2017</u> |
| <b>Fecha de recepción:</b>                       | <u>22 / 06 / 2018</u>                            |
| <b>Fecha de evaluación:</b>                      | <u>   </u> / <u>   </u> / 20 <u>   </u>          |

**I. Título del proyecto**

**CARACTERIZACIÓN DE LA CORRIENTE DE POTASIO TIPO RECTIFICADOR TARDÍO POR LA BRADIQUININA EN NEURONAS SIMPÁTICAS**

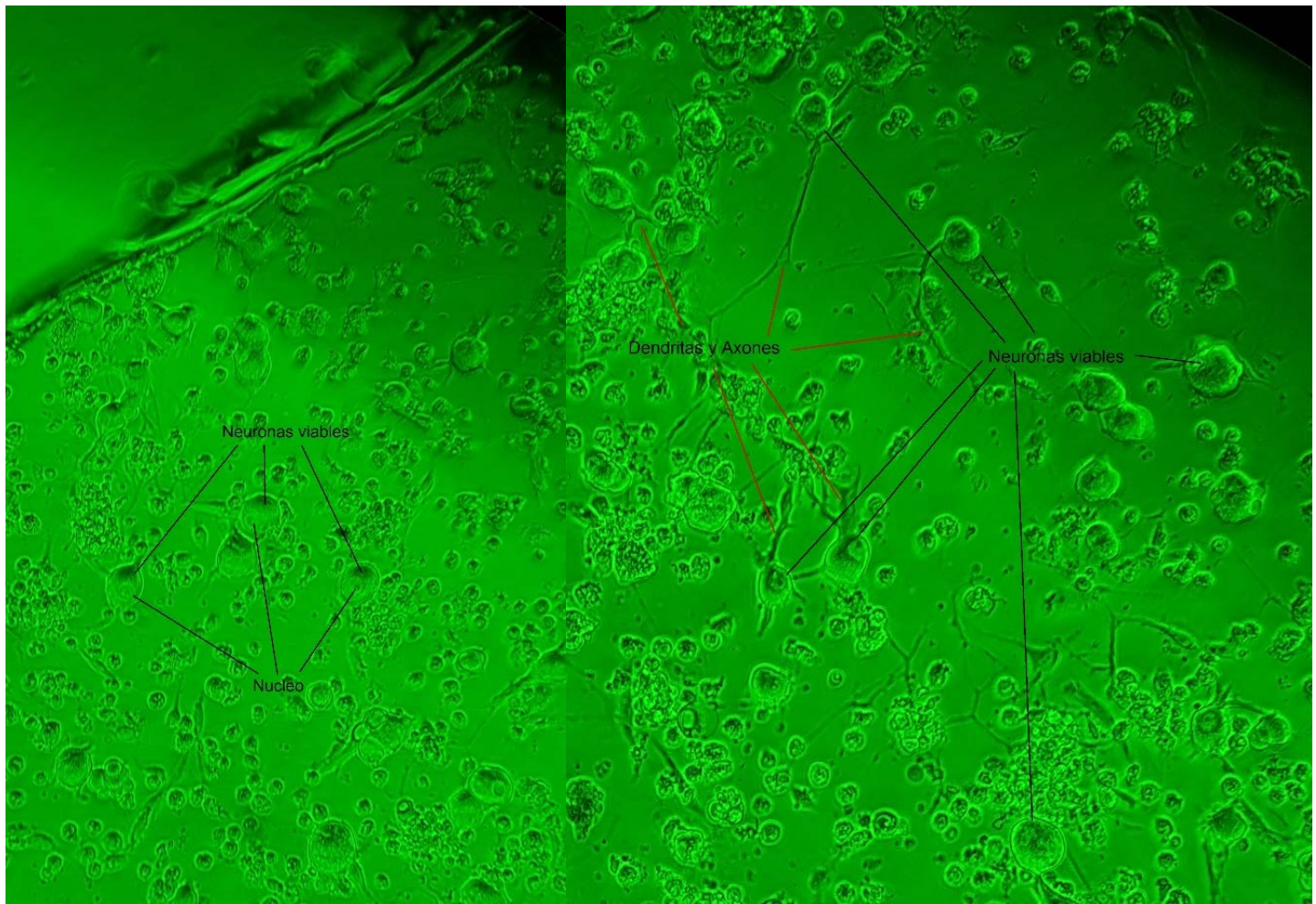
**II. Resumen (Máximo 200 palabras)**

Mucho se ha descubierto del control de la presión arterial y los flujos locales de sangre a los tejidos del cuerpo. De los mecanismos reguladores se sabe que de los más importantes es el sistema nervioso simpático, sin embargo, no es único en producir cambios en estas variables fisiológicas. La Bradiquinina, tiene efectos biológicos muy variables, como: reacciones alérgicas, shock séptico, hipotensión, es neuromodulador y regulador de la función renal. Es un potente vasodilatador con caída de presión, sin embargo, tiene la capacidad de aumentar la excitabilidad en neuronas simpáticas. Esto es interesante ya que la vía simpática libera noradrenalina que es un potente vasoconstrictor periférico contribuyendo al aumento de la presión arterial. La bradiquinina ocasiona vasodilatación en vasculatura periférica, pero estimula la vía simpática haciendo lo contrario, cual es la razón de lo anterior. Lo que pensamos al respecto es que el control de flujo sanguíneo es complejo, ya que para tener un flujo se requiere de una diferencia de presión (sistema de alta a baja presión). Al saberse poco de los mecanismos de la bradiquinina sobre neuronas simpáticas nos dimos a la tarea de saber más al respecto, de aquí el presente proyecto.

### III. Principales resultados

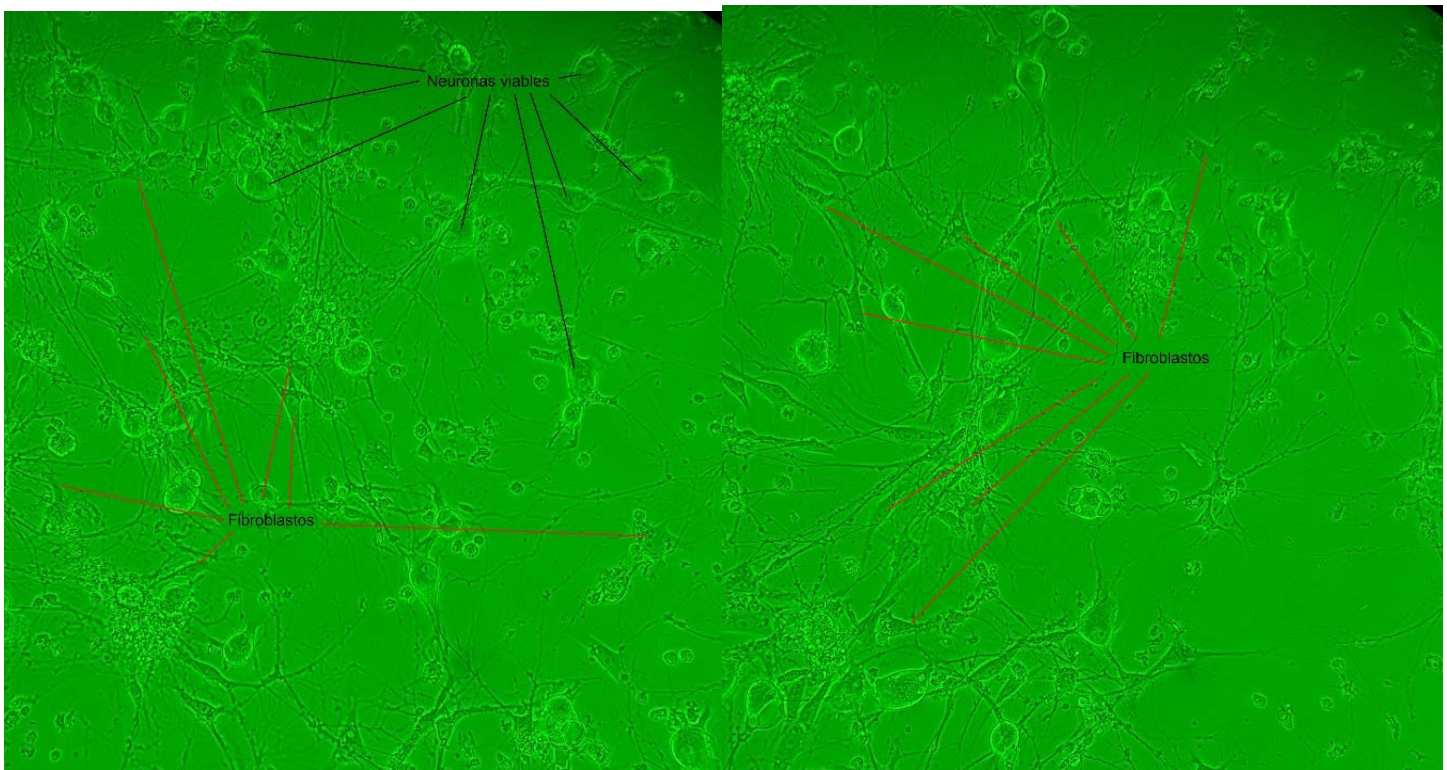
#### Caracterización de cultivo primario de neuronas simpáticas de rata

Una vez que se conoció y aprendió el manejo de equipo de laboratorio y preparación de soluciones fisiológicas, se procedió a obtener y caracterizar el cultivo primario de neuronas simpáticas, entre ellos los tiempos a usar de enzimas de dispersión (Papaína, Colagenasa II y Dispasa), ya que esto es sumamente importante ya que todo el experimento en si radica en que tus células estén dispersadas, pero no tan dañadas para que estén en proceso apoptótico. A continuación, les muestro fotos de neuronas en cultivo primario de 24 horas, donde se observan neuronas viables listas para registro (Figura1). Aquí después de varios intentos se logró obtener neuronas viables del ganglio cervical superior, con 30 minutos de tiempos de enzima con dos intervalos de dispersión mecánica muy pero muy suave.



**Figura1: Neuronas en cultivo primario de 24 horas post dispersión.** Se aprecian neuronas bien definidas en campo claro con objetivo de 20X. Se pueden apreciar parte de ellas como son dendritas y axones las cuales son características de este tipo celular, cabe resaltar que para registro electrofisiológico es necesario que la neurona sea lo más redonda posible siendo este tiempo suficiente al parecer para que la neurona esta fuerte pero que todavía no haga axones o dendritas que le hagan perder lo esferoide. También un detalle importante que a este tiempo prácticamente no se observan fibroblastos lo cual está muy bien ya que para nosotros este tipo de célula es un parásito por que se desarrolla muy rápido opacando a las neuronas que se pueden tener en nuestro cultivo. También en esta figura y de menor importancia se observan muchas células de tamaño pequeño en comparación a las neuronas señaladas, estas células no son de interés ya que podrían ser neuronas que perdieron su capacidad de regular su volumen por apoptosis o pudieran ser restos de glóbulos rojos que quedaron del proceso de obtener el cultivo primario.

A 48 horas se aprecian neuronas y muchos fibroblastos, células que al igual de las neuronas pareciera que tienen dendritas o axones sin embargo no lo son, además de que este tipo de célula en comparación a la neurona se aprecian más delgadas y estrelladas y no esféricas o redondas con profundidad, esto al momento de observar en el microscopio (Figura 2), lo que nos estaría indicando que una vez obtenido el cultivo celular tenemos máximo 36 horas para poder trabajar con él, ya que el fibroblasto, aunque no lo parece crece y tapa a la neurona lo que nos causaría un problema a la hora de registro electrofisiológico neuronal. Y por otro lado en este tipo de registro se requieren células lo más redondas posibles, a 24 horas no se aprecian deformaciones grandes de la neurona. Sin embargo, a 48 horas la neurona ya tiene las características de estas células como son dendritas y axones para la comunicación con otras células, de igual manera esto nos causaría un sinnúmero de problemas a la hora de registro electrofisiológico. Los experimentos se realizaron sin el uso de factores de crecimiento neuronales (posterior a 48 horas las neuronas empiezan a morir ya que para su supervivencia en largos periodos de tiempo se requieren factores de crecimiento) y bloqueadores de la división celular de fibroblastos (no permiten que el fibroblasto se siga dividiendo y pueda cubrir nuestras neuronas que son las de interés).

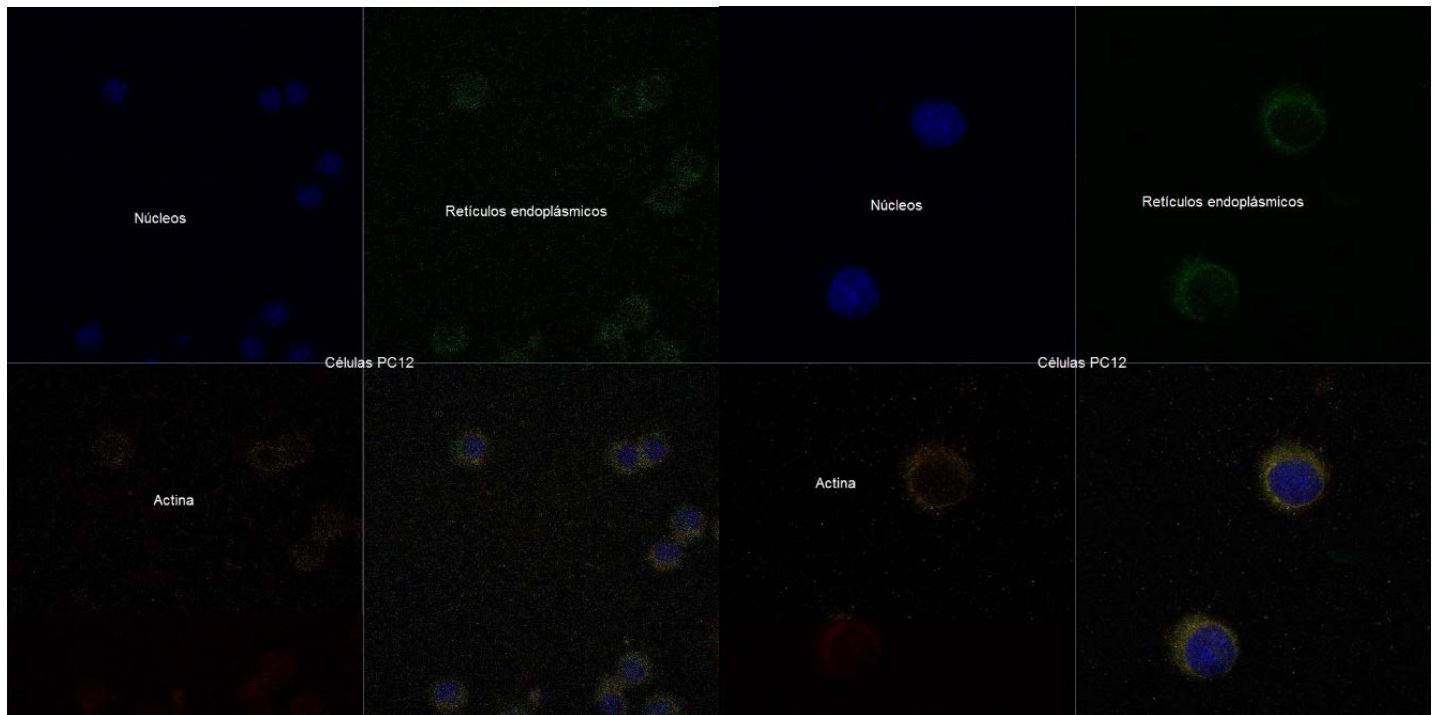


**Figura 2: Neuronas en cultivo primario de 48 horas post dispersión.** Se logra apreciar de igual manera que la figura anterior neuronas viables bien definidas, sin embargo, es fácilmente observable que a este tiempo la neurona tiene mayor número de dendritas y axones muy bien definidos siendo esto un problema para los posteriores registros electrofisiológicos. También se pueden observar un gran número de fibroblastos ya que entro más tiempo estos se siguen dividiendo. Esto sin duda es problema ya que forman una red sumamente abundante que puede tapar, aunque no lo parezca a la neurona.

En el mismo sentido de la caracterización de cultivo primario de neuronas lo que menciono arriba no nos dice a ciencia cierta si son realmente neuronas, para poder identificar esto, se puede hacer de dos maneras: una que es registrar las células y si generan potenciales de acción o corrientes iónicas de sodio, calcio y potasio, es indicativo de que efectivamente son neuronas (Figuras 6 y 7).

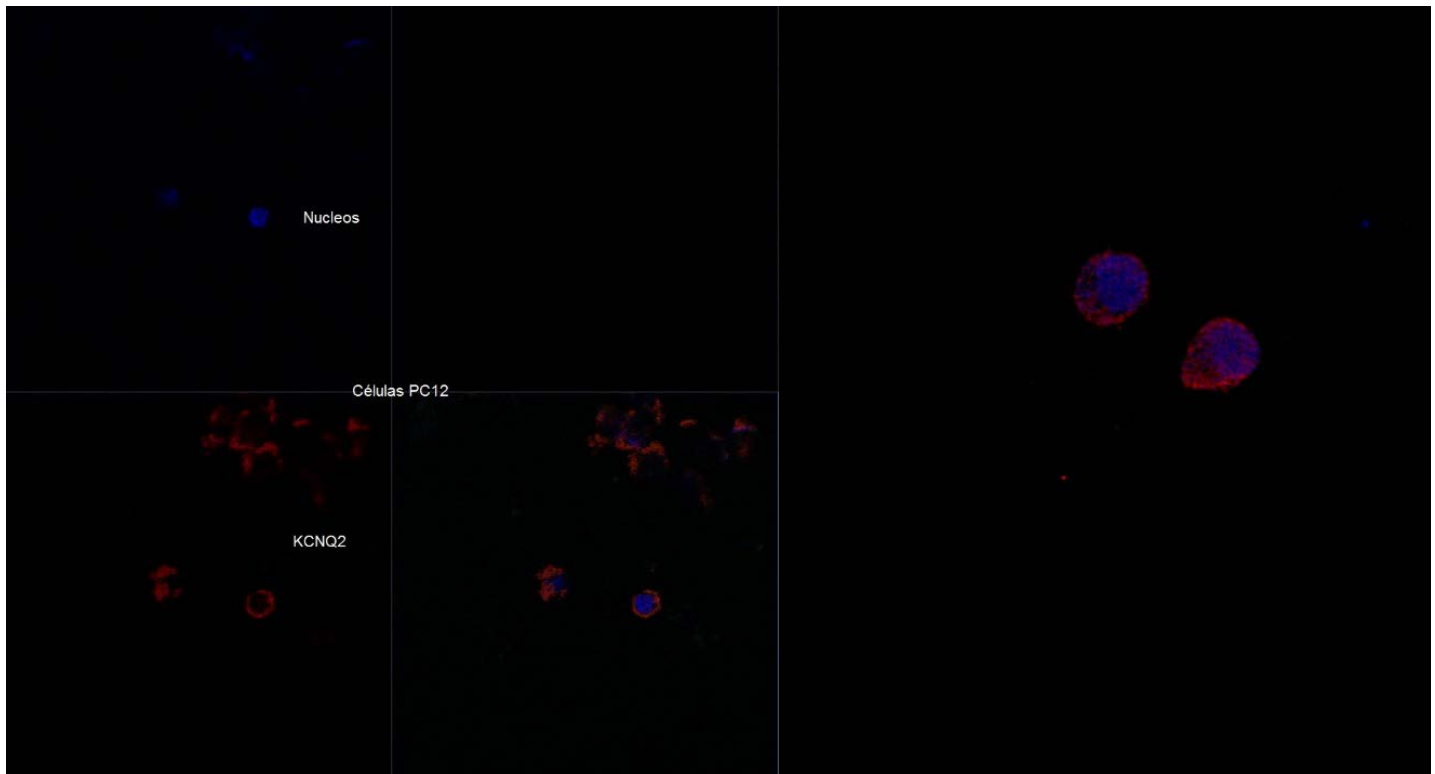
Otra forma es fijar sin perder las estructuras celulares con la técnica de formaldehído y suero fetal bovino para posteriormente poder hacer el marcaje por medio de inmunocitoquímica y observación con microscopia confocal (fluorescencia a partir de estimulación por láser, pero en un solo punto para que no genere fluorescencia de toda la muestra si no de lo que solo lo que se observa, ósea prácticamente conjunto de

células individuales), esto se logra gracias a células marcadas con anticuerpos poli o monoclonales específicos a alguna proteína específica y que a su vez pueden ser marcados con otro pero que este a distintas longitudes de onda emiten luz, gracias a que la proteína se puede encontrar en mayor densidad que otra en otra estirpe celular se generan mayores o menores fluorescencias.



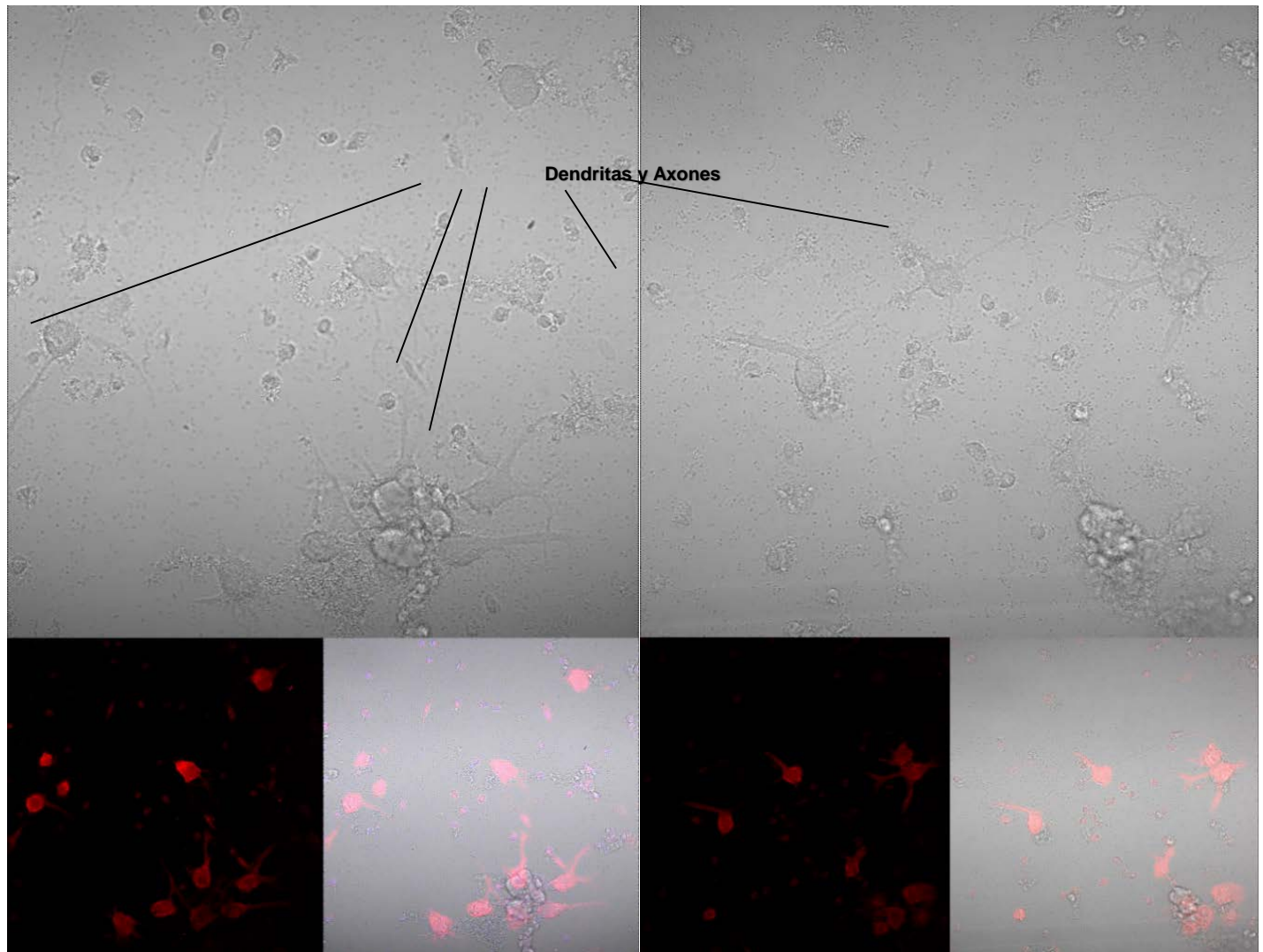
**Figura 3: Células PC12 con marcaje de inmunocitoquímica.** Se puede apreciar en ambas figuras el marcaje de retículo endoplásmico en color verde (recuadros superiores derechos). El núcleo se observa claramente en color azul (recuadros superiores izquierdos), y muy poco el marcaje en color amarillo de actina (recuadros inferiores izquierdos). En los recuadros inferior derechos se observa las mismas células con supe posicionamiento de cada una de las fluorescencias correspondientes a los marcadores inmunocitoquímicos.

Un ejemplo de esto es las subunidades proteicas que forman los canales iónicos ya mencionados con anterioridad. Uno de estas subunidades es la KCNQ2 la cual se sabe que está en la membrana de neuronas y en algunas estirpes celulares diferenciadas, pero no o mucho menor en fibroblastos, siendo pues esta una forma de identificar a dichas células. Sin embargo, antes de cualquier cosa es aprender estas técnicas de marcaje y microscopia especializada. En la figura 3 les muestro marcaje con inmunocitoquímica de células PC12 donde se usaron tres tipos de anticuerpos monoclonales primarios con sus respectivos anticuerpos monoclonales secundarios con regiones fluorescentes para posterior identificación, (caracterización de concentración de soluciones y anticuerpos para posterior observación con microscopia confocal). En azul tenemos marcaje de núcleos con 4,6Diamidino-2-fenilindol (DAPI), el retículo sarcoplásmico en verde y actina en amarillo, esto fue gracias al utilizar anticuerpos monoclonales de rata. Posteriormente se procedió a marcar células PC12 con el anticuerpo monoclonal contra KCNQ2 (figura 4) que se aprecia claramente en rojo y en la periferia indicando que efectivamente la subunidad se encuentra inmersa en la membrana plasmática. También la identificación del núcleo con DAPI (coloración azul, figura 4).



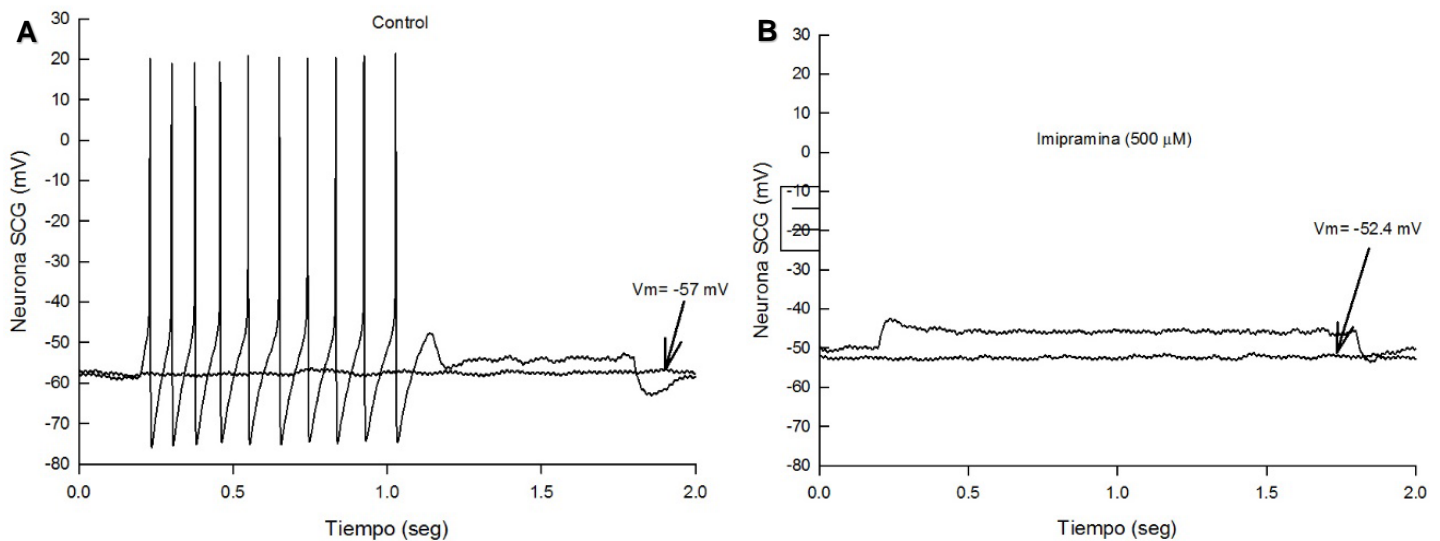
**Figura 4: Células PC12 con marcaje de anticuerpo monoclonal contra subunidad KCNQ2.** En las figuras se muestra los núcleos con tinción azul con DAPI, y en rojo básicamente en todo lo que es la célula específicamente la membrana de la subunidad KCNQ2 (subunidad que, en conjunto con otras 3 subunidades, generan la corriente iónica de potasio conocida como el tipo M) En la figura de la derecha con microscopia confocal se sobreponen las epifluorescencias, correspondiendo que el núcleo en azul corresponde a células, ya que el marcaje se puede observar en toda la célula.

Una vez que se aprendieron y caracterizaron (concentraciones de trabajo de anticuerpos) las técnicas en células PC12, se procedió a realizar el marcaje de neuronas para su posterior identificación y la caracterización de cultivos primarios de neuronas. Lo anterior se puede apreciar en la figura 5, se observan claramente grupo de células con prolongaciones (axones o dendritas) tanto en luz blanca (figura 5 superiores) como con epifluorescencia (figura 5 inferiores izquierda) que sería el marcaje de células que contienen la subunidad KCNQ2 (rojo), claramente se observa que todas las células mostradas se observan de rojo indicando que la subunidad del canal de potasio se expresa o se encuentra en todas las partes de las células. También en la figura 5, se puede apreciar el sobre posicionamiento de ambas figuras donde concuerdan que las células observadas en campo claro son efectivamente las marcadas de color rojo, indicándonos en primera instancia que expresan la subunidad KCNQ2 y en segunda estancia nos dice que son neuronas ya que esta subunidad se expresa abundantemente en neuronas para generar la corriente de potasio tipo M, corriente iónica importantísima en la excitabilidad neuronal.



**Figura 5: Neuronas del ganglio cervical superior de 24 horas post dispersión, marcadas con anticuerpos monoclonales hacia la subunidad KCNQ2.** Se puede apreciar en las partes superiores de la figura células en campo claro (40X), en estas se puede apreciar muy sutilmente el cuerpo celular, así como estructuras clásicas de las neuronas (dendritas y axones). Estas células fueron marcadas con el anticuerpo hacia KCNQ2 donde se puede apreciar en las figuras de abajo e izquierda las mismas células en color rojo, indicando que las neuronas expresan la subunidad KCNQ2 (40X). Más aun en las figuras de abajo derecha se puede apreciar el sobre posicionamiento de la foto en campo claro y con epifluorescencia donde concuerda perfectamente las células.

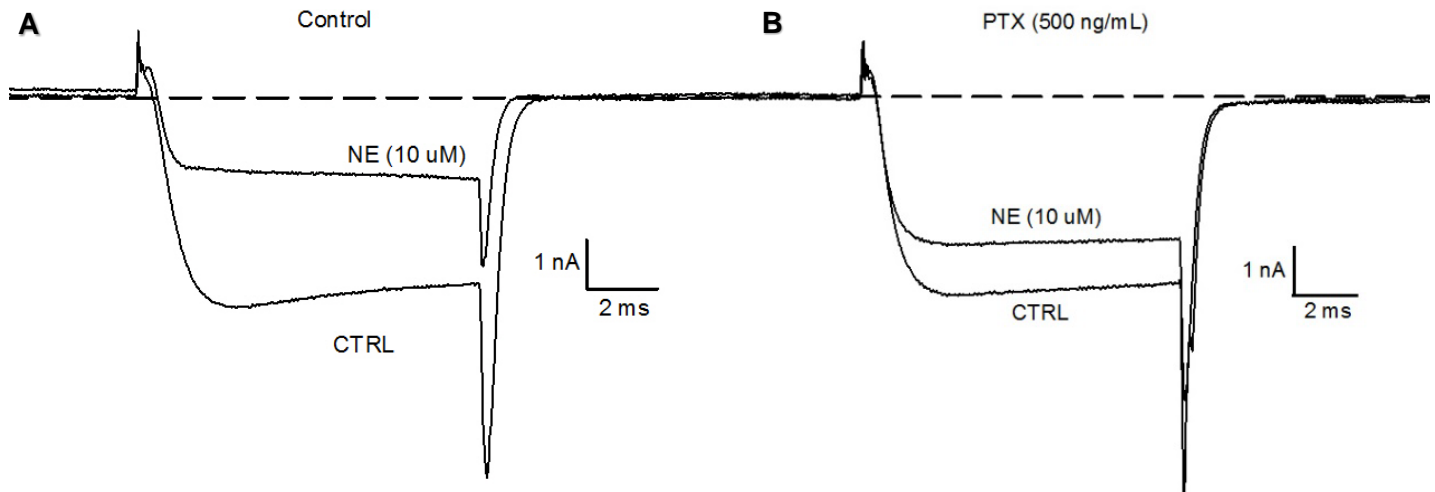
Una vez que se llevó a cabo la caracterización de la obtención de cultivos primarios de neuronas del ganglio cervical superior, se procedió, por un lado a caracterizar la generación, registro, estimulación y análisis de neuronas simpáticas para la generación de potenciales de acción y a la par el efecto farmacológico de la Imipramina sobre las mencionadas neuronas, además del registro de corrientes iónicas con el set de registro electrofisiológico de la marca HEKA electronics y manejo de este con el programa Pulse versión 8.2. Para esto se realizaron cultivos primarios de neuronas de 24 horas post dispersión. En la figura 6A se puede apreciar el registro del voltaje de membrana que fue igual a  $-57$  mV y la generación de potenciales de acción a un pulso de inyección de corriente de  $150$  pA, las neuronas registradas tuvieron un patrón de disparo de fásicas o adaptativas. De similar manera en la figura 6B se registró el voltaje de membrana que fue de  $-52$  mV (menos negativo que en la situación control), y al pulso de inyección de corriente de  $150$  pA no generó ningún potencial de acción, sin embargo, cabe aclarar que este grupo de neuronas fueron tratadas previamente con Imipramina  $500$   $\mu$ M.



**Figura 6: Efecto de la Imipramina sobre el potencial de membrana y potenciales de acción en neuronas del ganglio cervical superior.** En la figura A se muestran dos pulsos en la condición control, en fijación de corriente, el primero que corresponde a registrar el voltaje de membrana de -57 mV ( $V_m$ ) y el segundo pulso a 150 pA de inyección de corriente la cual se puede apreciar la generación subsecuente de potenciales de acción de manera adaptativa. En comparación la figura B muestra los mismos pulsos sin embargo con la adición al baño de la cámara de registro electrofisiológico de Imipramina 500  $\mu$ M. Se puede apreciar claramente que el voltaje de membrana es a valores no tan negativos (de -57 a -52 mV) y en el mismo sentido el pulso de 150 pA de inyección de corriente no genera ningún tipo de potencial de acción.

Para esclarecer por qué en presencia de Imipramina hay un voltaje de membrana menos negativo y ha pulsos de inyección de corriente (150 pA) no se generan potenciales de acción, veamos qué es lo que hace la Imipramina. Este fármaco se da como terapéutica de la depresión, se sabe que su efecto farmacológico es la disminución de la excitabilidad de estirpes neuronales reguladoras (principalmente neuronas inhibitorias), a detalle se sabe que es un bloqueador de la corriente de potasio tipo M ( $I_{KM}$ ) y esta corriente es en las neuronas del ganglio cervical superior la principal corriente que mantiene el potencial de membrana a valores negativos, ya que es una corriente de bajo umbral (su cinética de apertura es a valores muy negativos) y además no presenta inactivación por voltajes a valores positivos. Entonces al ser un canal que genera una corriente de potasio saliente constante a valores negativos, mantiene el potencial a valores negativos (salida de cargas de potasio positivas del interior al exterior de la célula), sin embargo al adicionar o estimular con Imipramina (bloqueador de este canal) las cargas positivas se quedan dentro de la neurona por lo que contribuye a un cambio a valores menos negativos del potencial de membrana (de -57 mV a -52 mV) esto es suficiente para que esta neurona que en condiciones control genera potenciales de acción en la condición con Imipramina no genere dichos potenciales, esto por una pérdida de la excitabilidad que a detalle se describiría como inactivación por voltaje positivo de los canales de sodio. Se sabe que si los canales de sodio se encuentran en su estado inactivado no pueden generar corriente, solo hasta cuando el voltaje de la membrana se restablece a valores muy negativos. En base a que la corriente de potasio tipo M está bloqueada por la Imipramina estas cargas de potasio positivas no salen por lo que el interior de la célula se queda más positivo y esto es suficiente para que no se remueva la inactivación de las corrientes de sodio y por lo tanto, no generación de potenciales de acción a inyección de corriente al menos 150 pA. Sin duda se comenzó a esclarecer efectos farmacológicos sobre estas neuronas.

En el mismo sentido y al querer ver la participación de neuropéptidos o fármacos y las cascadas de señalización que subyacen a estas sustancias, se procedió a caracterizar y análisis de corrientes iónicas en neuronas de ganglio cervical superior. En la figura 7 se muestran corrientes de calcio tipo N ( $I_{CaN}$ ) y el efecto que tiene la Norepinefrina 10  $\mu$ M (NE). Claramente se puede observar la corriente entrante control (hacia abajo de la línea discontinua) y una menor corriente con la aplicación de NE (figura 7A).



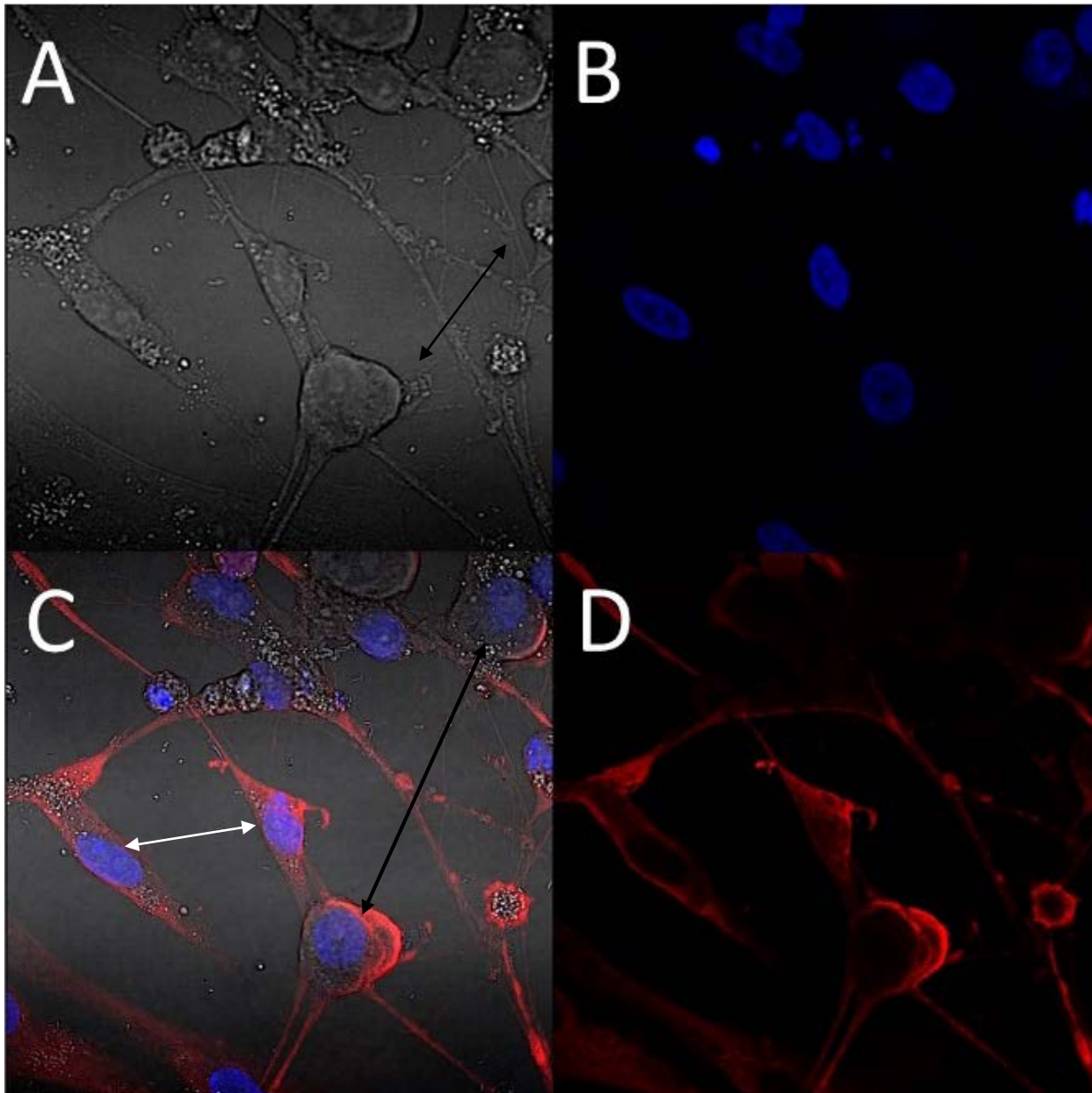
**Figura 7: Efecto de la toxina Pertusis sobre el efecto que tiene la Norepinefrina sobre la corriente de Calcio tipo N en neuronas del ganglio cervical superior.** En la figura A se muestra el registro característico de la corriente entrante de calcio tipo N (trazo ctrl), al aplicar al baño de registro electrofisiológico, Norepinefrina la corriente mencionada es inhibida, esto se puede apreciar como una menor cantidad de la corriente mencionada (trazo NE 10  $\mu$ M). Sin embargo, en la figura B se aprecia de igual manera la corriente de calcio tipo N y al aplicar NE la inhibición es mucho menor, cabe resaltar que estos registros son en un grupo de neuronas que fueron incubadas durante toda la noche con la toxina pertusis.

De similar forma, pero al querer esclarecer o cuales son los elementos involucrados en como la NE inhibe a la  $ICa_N$ , se procedió a utilizar la toxina pertusis (figura 7B) para identificar si el receptor a NE está o no está acoplado a la proteína Go/i; La toxina pertusis ocasiona que la proteína Go/i se desacople de sus receptores por lo que la señalización que involucra Go/i. En este experimento nos estaría indicando que la NE utiliza un receptor acoplado a la proteína Go/i. Esto se infiere ya que se puede observar una disminución notable del efecto inhibitorio que tiene la NE sobre la  $ICa_N$  (Figura 7B) en comparación a la situación control donde el efecto inhibitorio es mayor (Figura 7A), esto nos indica que la modulación que tiene la NE sobre la  $ICa_N$  involucra a la proteína Go/i que a su vez ocasiona que se disminuya la actividad de la adenilato ciclasa y con ello la disminución celular de adensin monofosfato cíclico (AMPC), segundo mensajero por excelencia). Con estos resultados esclarecemos un efecto farmacológico y a la vez caracterizamos el set de registro electrofisiológico del laboratorio de Neurobiología.

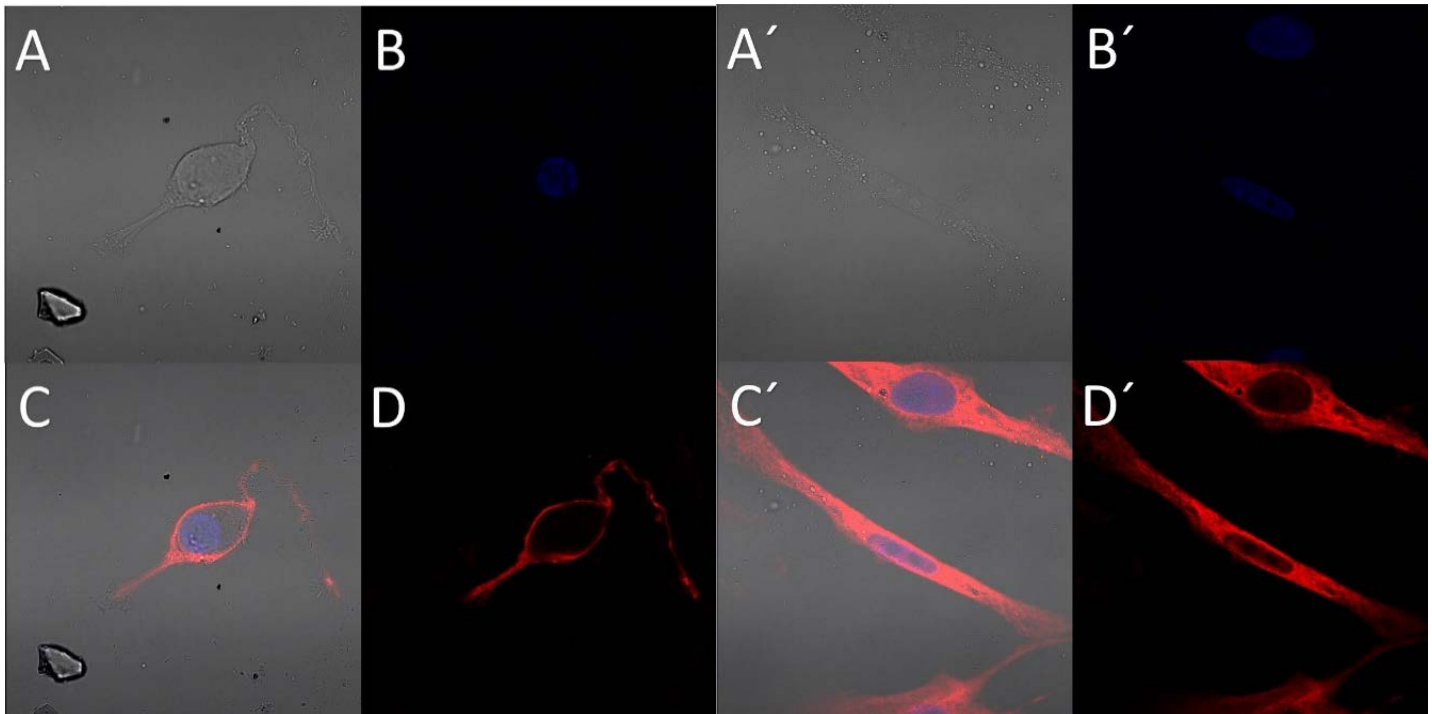
A la par de los experimentos y resultados anteriores se llevó a cabo la perfección de la técnica de marcaje inmuno – histoquímica ya que como mencione en el reporte anterior se logró el marcaje de la subunidad KCNQ2 principalmente de células pc12. Posteriormente de neuronas simpáticas de ganglio cervical superior (GCS). Sin embargo en estas últimas se nos presentó un problema, estas células al querer teñir el núcleo para identificar en su totalidad las neuronas del ganglio y otras estirpes celulares (fibroblastos) con 4,6Diamidino-2-fenilindol (DAPI), las células específicamente los núcleos se reventaban dando el marcaje de la célula solo de la membrana de la subunidad KCNQ2; cabe aclarar que en las células pc12 si se pudo marcar el núcleo, esto probablemente a que son células muy pequeñas en comparación a las neuronas ya que son de 10 micras y 50 micras respectivamente. Llegamos a la conclusión que al momento de poner el cubreobjetos para su observación en el microscopio confocal este cubreobjetos las pudiera estar aplastando. Lo que se realizó para resolver esta problemática fue que se pusieron pequeños vidrios como separador entre la muestra y el cubreobjetos, logrando con éxito el marcaje de por un lado en la membrana el KCNQ2 y por otro los núcleos tanto de neuronas como fibroblastos. Con esto entonces se logró el mejoramiento de la técnica mencionada, al menos para cultivo primario de neuronas y las estirpes células que se presentan a la hora de obtener el cultivo de neuronas a partir de ganglio cervical superior. En la figura 8 se muestran células de cultivos primarios (48 horas pos dispersión) de neuronas que se obtuvieron a partir de ganglios cervicales superiores de rata, fijados y posteriormente marcado con DAPI (Núcleo, azul), subunidad KCNQ2 (membrana, rojo). Se pueden apreciar tanto neuronas como fibroblastos, de los cuales se pueden identificar ambos en



primera instancia por su morfología, en segundo lugar por su intensidad de fluorescencia roja (análisis mostrado en la figura 10 de la subunidad KCNQ2) y en tercer lugar el núcleo ya que se encontró que este orgánulo en los fibroblastos es alargado y su contenido es altamente denso, a lo cual da una coloración de un azul intenso, a diferencia de los núcleos de la neuronas que son más grandes, completamente redondos y su material genético es más disperso, por lo que da una coloración azul tenue. De igual manera en la figura 9 se puede apreciar por un lado a una sola neurona (figura 9C) y por otro a fibroblastos (9C'), claramente se pueden apreciar las diferencias mencionadas anteriormente. En estas figuras (1 y 2) se encuentran fotografías tanto de neuronas como de fibroblastos en campo claro (8A, 9A y 9A'), en 8B, 9B y 9B' la emisión en azul de los núcleos (marcaje con DAPI) en 8D, 9D y 9D' la emisión en rojo de la subunidad KCNQ2 y por último en 8C, 9C y 9C' el súper posicionamiento de todas las demás.



**Figura 8: Cultivo primario de ganglio cervical superior de rata.** Se puede apreciar neuronas y fibroblastos en cultivo primario de 48 horas en campo claro (A), epifluorescencia confocal de los núcleos celulares en azul (B), súper posicionamiento de las distintas fotografías (C) y epifluorescencia en rojo de la subunidad KCNQ2, que correspondería a una proteína anclada a las membranas celulares (D). Neuronas son identificadas gracias a la flecha en negro en donde el núcleo correspondiente a esas células se puede identificar redondo y tenue en comparación a fibroblastos identificados con la línea blanca del cual los núcleos que les corresponden son alargados con un intenso color azul. Aunque la subunidad KCNQ2 (rojo) es o se creía que se encontraba solo en células excitables (formación de canales iónicos responsables de la excitabilidad de algunas células) aquí se demuestra que el fibroblasto también expresa la mencionada subunidad proteica.

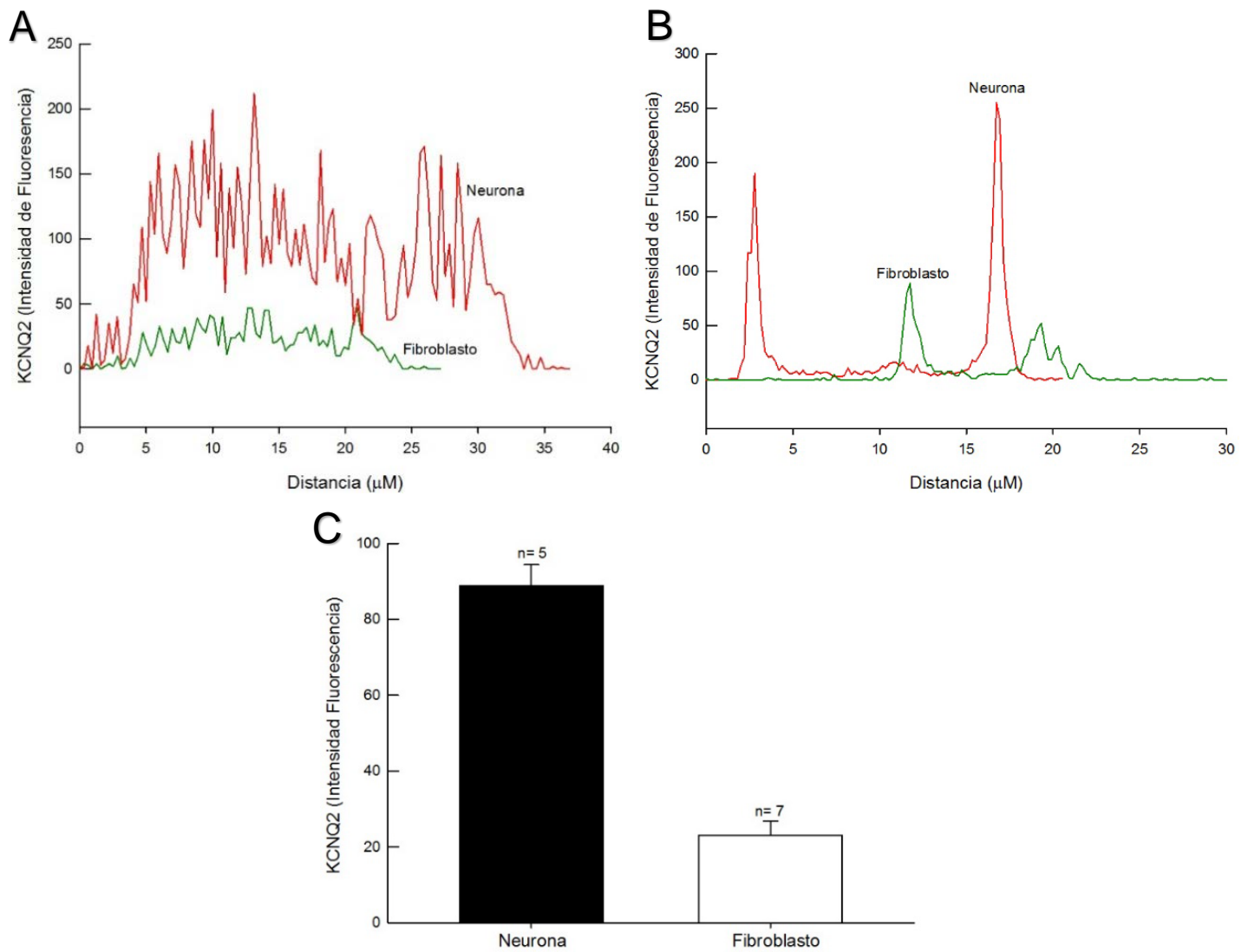


**Figura 9: Neurona y fibroblasto en cultivo primario.** Se puede apreciar en A y A', fotografía en campo claro de una neurona y fibroblastos en cultivo primario de 48 horas. En B y B' la epifluorescencia confocal en azul de los núcleos la cual claramente se puede apreciar que el de la neurona es completamente redondo en comparación al de los fibroblastos que es alargado. En C y C' el súper posicionamiento de todas las fotografías para poder apreciar bien la célula y sus componentes marcados los cuales son los núcleos (azul) y la membrana el cual contienen a las subunidades KCNQ2 (rojo). En D y D' se aprecia solo la epifluorescencia confocal del marcaje de la subunidad KCNQ2 que corresponde a una proteína de membrana, por lo cual esto nos ayuda a apreciar perfectamente la morfología de estas células. La neurona se puede apreciar lo que fuera axón o dendritas y en el fibroblasto alargado fusiformes.

Cabe mencionar el hallazgo de que los fibroblastos también expresan a la subunidad KCNQ2 (figuras 8 y 9 D'), al igual que las neuronas y otras extirpes excitables, sin embargo, el fibroblasto se sabe que no tiene características de excitabilidad, también pareciera que expresan en muy similar cantidad la subunidad mencionada por lo que nos dimos a la tarea de llevar a cabo dicho análisis.

Gracias a la microscopía confocal y por medio del software ZEN blue, se puede hacer un análisis de la emisión de epifluorescencia y con esto saber si expresa en igual cantidad la subunidad KCNQ2 expresada en fibroblastos de cómo la expresan las neuronas GCS de rata. Esto sin duda nos dará más información para identificar y con esto poder hacer una mejor caracterización del cultivo primario de neuronas simpáticas como lo son las del GCS. Las células presentes en el cultivo primario de GCS contiene entonces por lo menos dos tipos celulares bien observados a las 48 horas postdisperción (Neuronas y fibroblastos), por lo pronto los fibroblastos no nos interesaría, al menos para los proyectos que se tienen en puerta), sin embargo surge la pregunta y el querer indagar para que o cual es la razón de que una célula a la cual no se le considera para nada excitable exprese dicha subunidad, más aún, si esta subunidad forma canales iónicos de potasio funcionales en la célula, la cual daría en ellas corrientes de potasio (futuros proyectos).

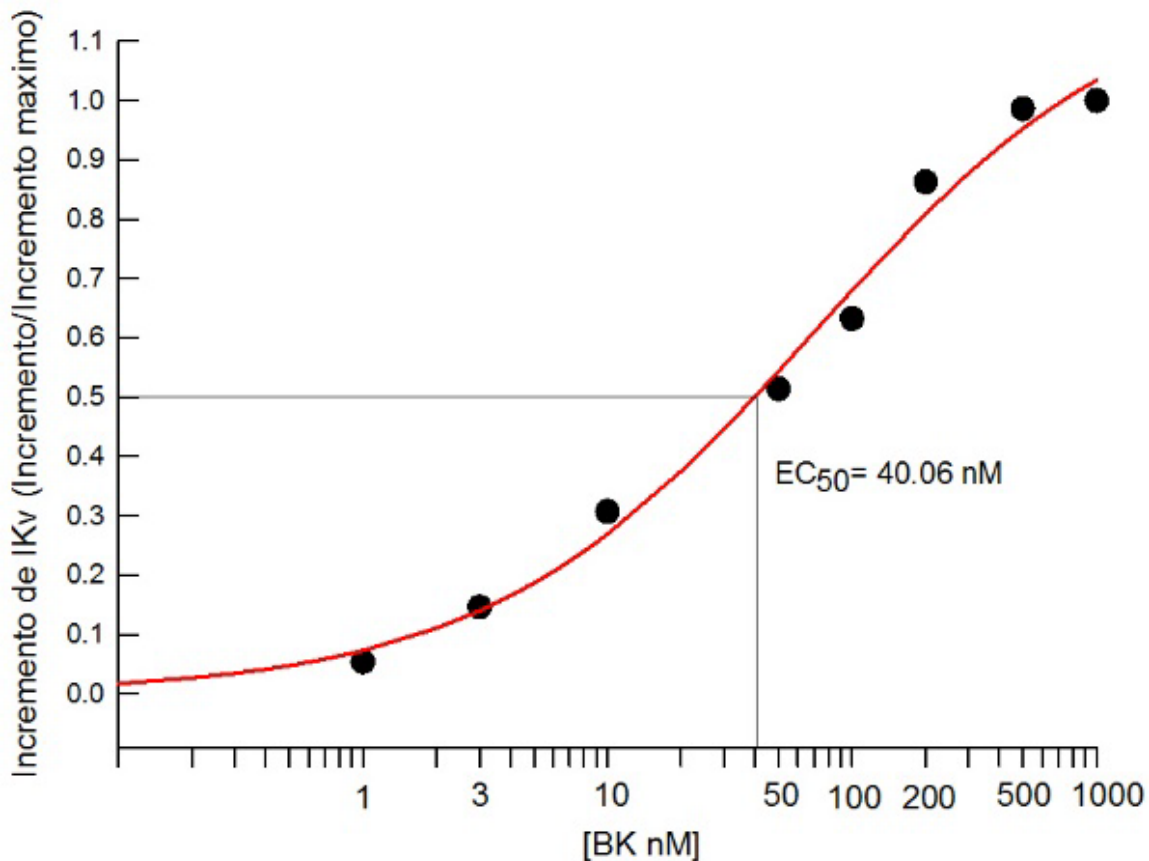
Como se mencionó el análisis de fluorescencia se llevó a cabo gracias al software ZEN blue, los resultados obtenidos se pueden apreciar en la figura 10, donde por un lado tenemos que algunas células tuvieron epifluorescencia confocal marcada en todo el soma celular (Figura 8D y 9D') y otro grupo de células solo tuvo esta epifluorescencia a los contornos de las células (Figura 8D y 9D) estos grupos fueron analizados por separado a lo cual en ambas estirpes celulares (neuronas y fibroblastos) mostraron expresión de la subunidad KCNQ2.



**Figura 10: Análisis de epifluorescencia confocal de la subunidad KCNQ2 de neuronas y fibroblastos.** En A se puede apreciar la intensidad de epifluorescencia confocal emitida por la subunidad KCNQ2 en todas las neuronas (rojo) y fibroblastos (verde), claramente se puede ver que la intensidad en neuronas es mucho mayor en comparación a lo observada en fibroblastos. En B se puede apreciar de igual manera la epifluorescencia confocal, pero de células que presentaron epifluorescencia a la periferia o contorno celular, como se puede ver en esta gráfica los picos corresponderían al mencionado contorno indicándonos por un lado que la neurona es más grande y que presenta mayor epifluorescencia emitida por KCNQ2. En C se muestra el resumen del análisis de las epifluorescencias mencionadas a lo cual en barras negras tenemos a las neuronas que dan una intensidad aproximada de 90 contra 20 de los fibroblastos (barras blancas).

La figura 10A nos muestra el análisis de células que presentaron claramente epifluorescencia en toda la superficie celular (Neuronas; líneas rojas y Fibroblastos: líneas verdes) y la figura 10B de igual manera, pero de las células que presentaron mayormente la epifluorescencia en los contornos celulares (nótese que la intensidad de la fluorescencia tiene picos, esto ya que estaría indicando el análisis de solo el contorno celular). Claramente se puede apreciar que la intensidad de fluorescencia es significativamente mayor en las neuronas que en la de los fibroblastos, este resultado se puede apreciar más a detalle en la figura 10C, la cual nos muestra el promedio de intensidad de fluorescencia de las células mencionadas siendo para las neuronas de aproximadamente de 90 contra solo de 20 en los fibroblastos. De este dato tenemos que, aunque es comparablemente menor la expresión de KCNQ2 en los fibroblastos en comparación a lo observado en la neurona, los fibroblastos si expresan a la mencionada subunidad y por lo tanto es muy posible y a manera de comprobarlo que estas células pudieran tener corrientes iónicas de potasio que pudieran tener alguna función especial en este tipo de células (análisis para futuros proyectos).

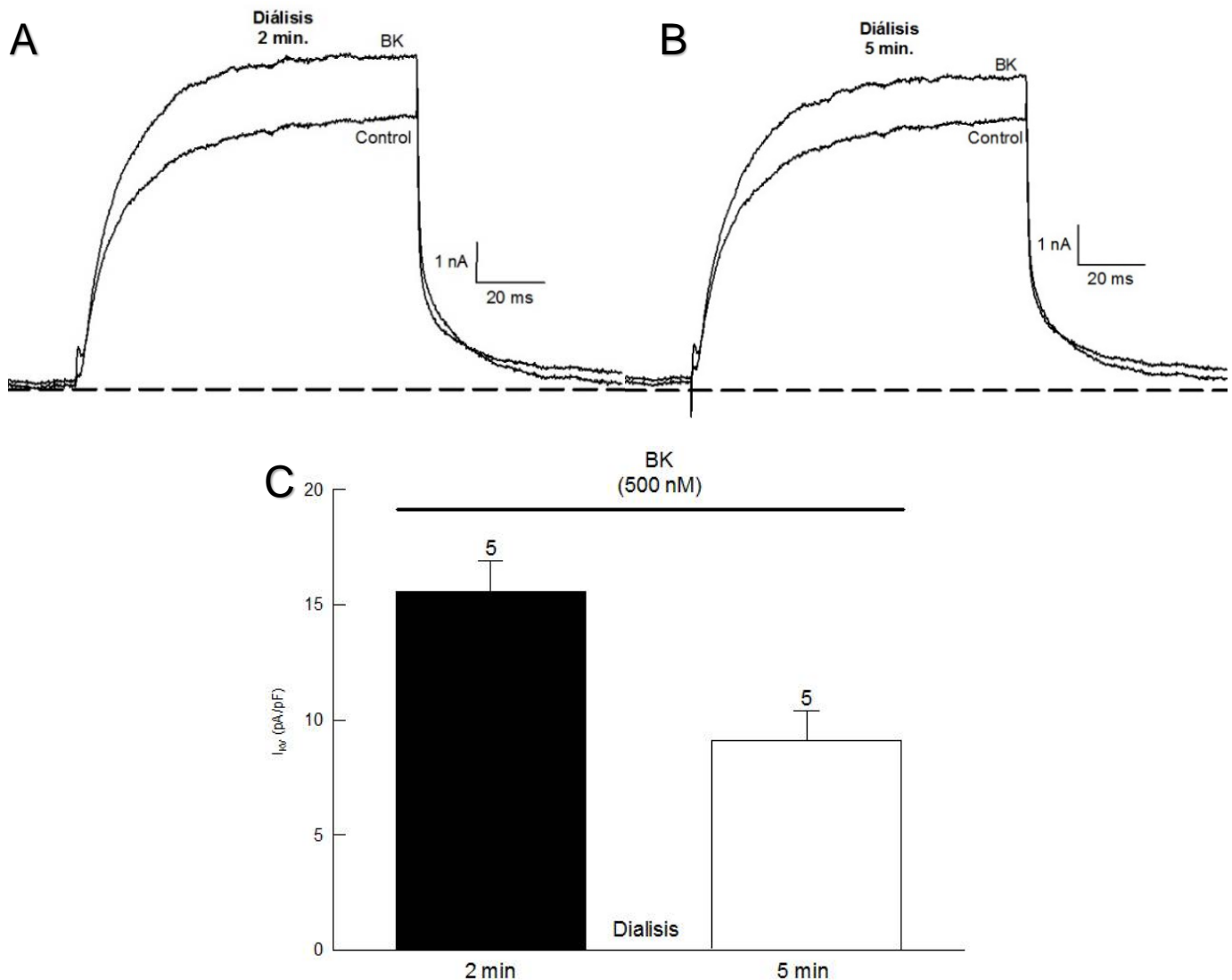
Una vez concluidos los experimentos de caracterización e identificación de neuronas se llevaron a cabo los estudios correspondientes al efecto que tiene la Bradicininina (BK) sobre la corriente de potasio tipo rectificador tardío (IKv) de neuronas simpáticas de rata. En primera instancia se llevó a cabo la caracterización del efecto de este fármaco con la mencionada corriente. Para esto se hizo un análisis y se obtuvo una clásica grafica dosis – respuesta. Esto se puede apreciar en la figura 11 donde los incrementos normalizados a 1 con respecto a la dosis mayor de BK, y al hacer una regresión no lineal sigmoidea de los datos se pudo obtener una gráfica donde el eje de las X al ser logarítmica y a partir de esto, se obtuvo una concentración media del efecto del incremento de la IKv por la BK, siendo de una  $EC_{50} = 40.06$  nM. El efecto máximo se encontró por arriba de los 500 nM. Una vez sabida la dosis del fármaco sobre la IKv se procedió a indagar un poco más sobre el efecto de la BK sobre la IKv.



**Figura 11: Curva Dosis – Respuesta de la BK sobre la IKv.** Se puede apreciar el efecto de varias concentraciones de BK sobre la IKv (puntos negros) en una gráfica normalizada en relación al mayor incremento de la corriente IKv alcanzada. La línea roja es el ajuste de regresión sigmoidea del cual se obtuvo una  $EC_{50}$  de 40.06 nM, la cual es la concentración media a la cual la BK incremento en 50 % a la corriente mencionada.

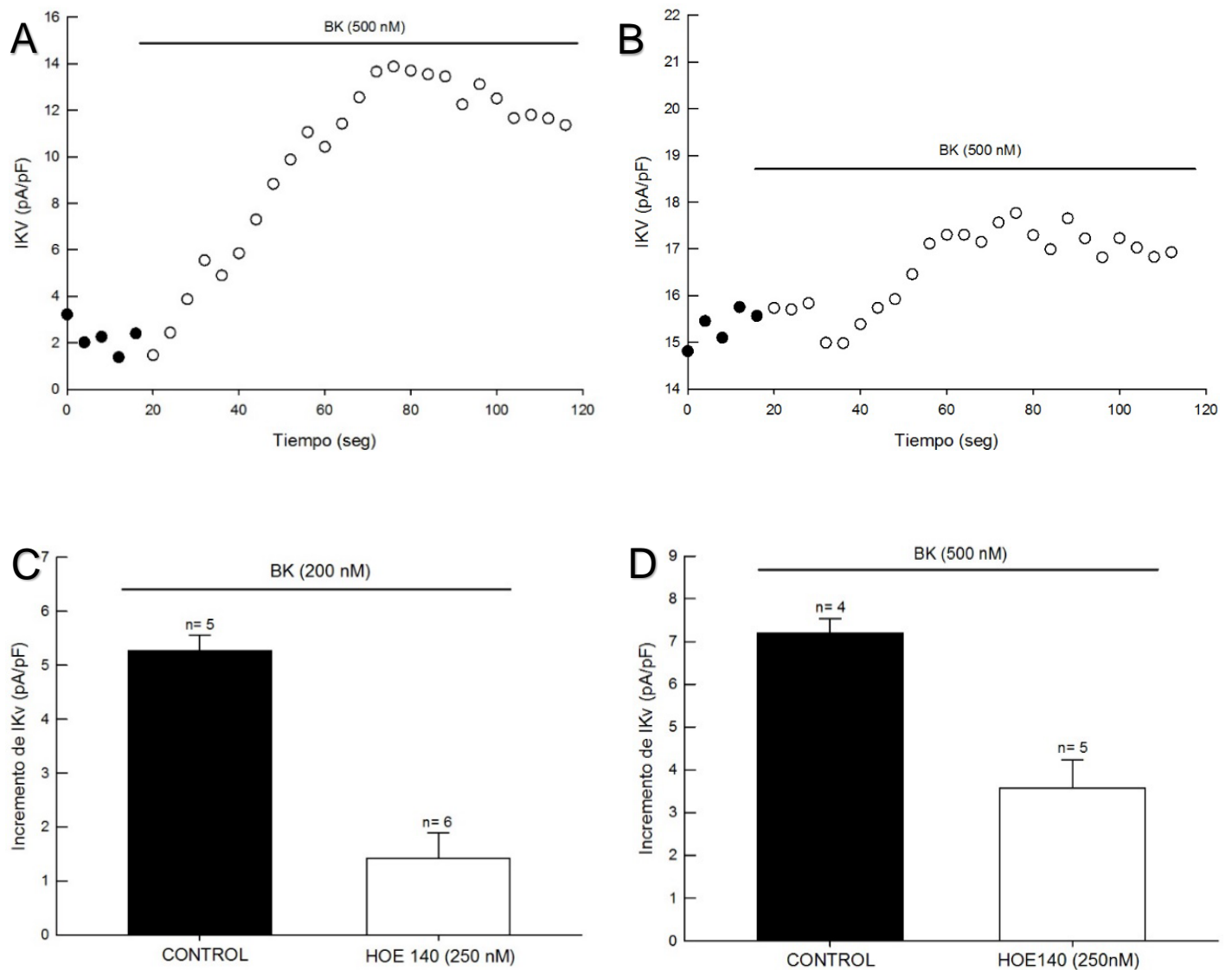
Una vez encontrado las concentraciones supra máxima de la BK sobre la de incrementar a la IKv, se procedió a caracterizar como se lleva el mencionado efecto. En primera instancia, se quiso ver si el incremento de la corriente es sensible a la diálisis, ya que varios experimentos que a realizar requieren de diálisis de estas células de por lo menos 2 y 5 minutos, además de que las cascadas de señalización podrían verse afectadas por dicha diálisis y con esto disminuir el efecto de la BK sobre la corriente de potasio (Figura 12). Esto es que a mayor diálisis más de los elementos citoplasmáticos son dializados hacia la pipeta de registro que está tocando a la célula. Se sabe que los efectos de la BK o de otros neuropéptidos sobre otras corrientes de potasio utilizan al receptor de Bradiquinina u otros receptores y que estos a su vez son receptores de 7 dominios transmembranales o acoplados a proteínas G, de las cuales se sabe que utilizan elementos citoplasmáticos. Al ver el efecto de la BK sobre el incremento de la IKv a diferentes tiempos de diálisis se encontró que a mayor tiempo de diálisis el incremento observado fue menor, esto se puede apreciar en la

figura 12 donde se obtuvieron 15.38 y 8.54 pA/pF a 2 y 5 minutos de diálisis respectivamente. Esto sin duda nos habla que muy probablemente el efecto de incremento está utilizando elementos citoplasmáticos que se pierden o se ven comprometidos a mayor diálisis.



**Figura 12: Efecto de la diálisis sobre el incremento de la BK sobre  $IK_v$  en neuronas GCS de rata.** En A y B se pueden apreciar registros característicos de la corriente  $IK_v$  a 2 y 5 minutos de diálisis (A y B respectivamente). Claramente se puede apreciar que a partir de una corriente control la posterior adición de BK 500 nM produce un incremento en la corriente siendo mayor para una diálisis de 2 minutos que de 5 minutos. En la figura C se muestra el resumen de estos experimentos a lo cual se puede apreciar en barras negras el incremento de la BK a una diálisis de 2 minutos el cual fue de aproximadamente 15.5 pA/pF (n= 5) contra solo 9.5 pA/pF (n=5) a una diálisis de 5 minutos (barras blancas).

En el mismo sentido de seguir descubriendo o de caracterizar al efecto de la BK sobre el incremento de la  $IK_v$ , se procedió a encontrar por medio de cual receptor se lleva a cabo dicho efecto ya que se sabe que la BK no puede pasar la membrana celular por lo que dicho efecto tiene que ser por medio de algún receptor, también se sabe que en las neuronas simpáticas del GCS se expresan tanto el receptor a la Bradiquinina tipo 1 como el tipo 2. Más aún que la mayoría de los efectos que tiene la BK sobre modular otras corrientes de potasio en las neuronas, lo hace por el receptor a la BK tipo 2 por lo que muy posible la modulación de  $IK_v$  lo haga de igual manera. A manera de comprobarlo se llevó a cabo una serie de experimentos donde se utilizó un antagonista de receptor a la BK tipo 2, el HOE – 140 (Figura 13).

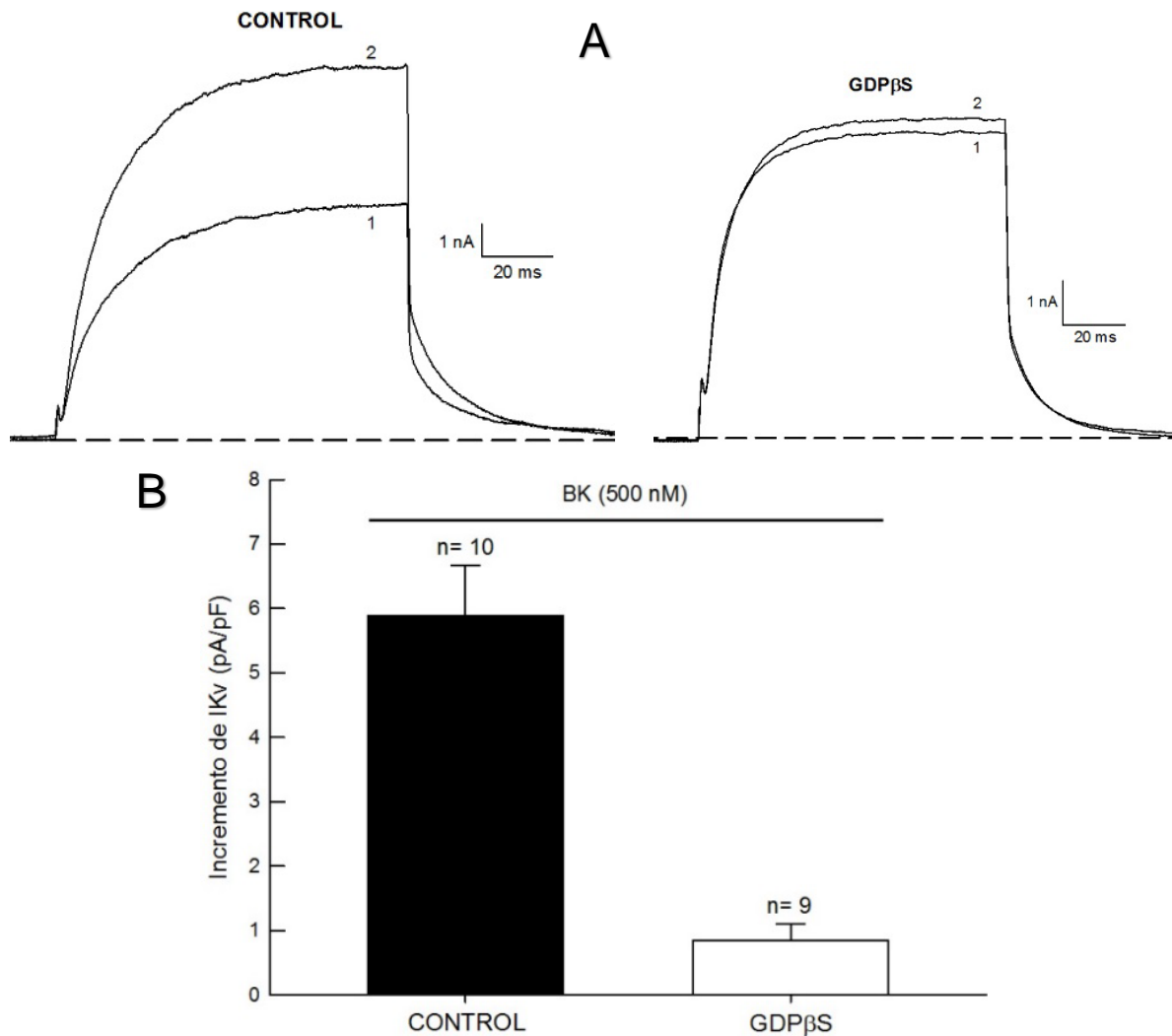


**Figura 13: Efecto del antagonista HOE – 140 sobre el efecto modulador de la BK sobre la IKv de neuronas simpáticas de GCS de rata.** En las graficas A y B, se puede apreciar el curso temporal del efecto de la BK (500 nM) sobre incrementar a la IKv en la situación control y en presencia de HOE – 140 (250 nM) respectivamnete. Estos resultados se resumen en la grafica D donde se puede apreciar claramente un incremento de aproximadamente 7.2 pA/pF ( barras negras; n= 4) en la situación control, en compracion de los solo 3.5 pA/pF (barras blancas; n=5) en presencia de HOE – 140. De similar manera se aprecia lo mismo en la grafica C donde el incremento de la BK (200 nM) sobre la IKv fue de 5.2 pA/pF (barras negras; n=5) contra un menor aumento en presencia del antagonista, siendo de 1.5 pA/pF (barras blancas; n=6). Notese que el aumento de la corriente en presencia del antagonista fue menor en comparacion a el aumento de la corriente en presencia del HOE – 140 pero de la grafica D, esto ya que se usaron distintas concentraciones de BK 200 y 500 nM respectivamente. En ambos experimentos el resultado fue significativamente menor en comparación a su control.

En dichos experimentos se puede apreciar en la figura 13A y B donde por un lado se muestra el curso temporal de la IKv antes y después de aplicarle BK (puntos negros y blancos respectivamente) y por otro el resumen de dichos experimentos a 200 y 500 nM de estimulación con BK (graficas 13C y D respectivamente). Se puede apreciar claramente que el incremento de la corriente por la BK es mayor en la situación control o sin el antagonista a receptor a BK tipo 2 (grafica 13A), mientras que al utilizar el HOE- 140 (250 nM) y posteriormente estimular con BK el incremento fue considerablemente menor (grafica 13B), estos resultados se puede apreciar más en la gráfica 13C donde los promedios de incrementos de la corriente por la BK (200 nM), fueron de aproximadamente 5.1 pA/pF (n=5) en la situación control contra solo 1.5 pA/pF (n=6) al estimular junto con el antagonista mencionado. Esto mismo se puede apreciar en la gráfica 13D, solo que aquí se utilizó mayor cantidad de BK (500 nM), con la misma cantidad de HOE – 140 (250 nM), se observa que el incremento de esta serie de experimentos fue de 7.2 pA/pF (n=4), contra 3.5 pA/pF (n=5), siendo menor de igual manera que en la gráfica 13C. Este aumento de la corriente al ser estimulada con mayor BK y en presencia del antagonista, pudiera ser ya que a mayor cantidad de BK (500 nM) gana un poco más los sitios de unión de la BK con su receptor que la del antagonista sobre el mismo receptor, alcanzando un estado mayor de activación el receptor a la BK y por lo tanto un mayor aumento, sin embargo, cabe resaltar que fue de igual manera que en 13C significativamente menor en comparación a la situación control. Estos resultados nos dicen pues que el efecto modulador que tiene la BK sobre incrementar a la IKv es o lo hace por medio del receptor a la BK tipo 2. En resumen, lo presentado hasta aquí es que se perfecciono la técnica de marcaje inmuno – histoquímico y observación confocal, así como el aprendizaje del software ZEN blue para análisis de epifluorescencia. Con esto la caracterización de dos estirpes celulares presentes en cultivo primario de ganglio cervical superior de rata. Por otro lado, se obtuvo la dosis efectiva media y dosis supra máxima de trabajo de la BK sobre la de incrementar a la corriente de potasio tipo rectificador tardío (IKv). En el mismo sentido se encontró que el efecto de la BK sobre la IKv es mediado por el receptor a la Bradiquinina tipo 2. Y que este efecto es sensible a la diálisis.

Una vez que se realizó la curva dosis – respuesta de la Bradicinina (BK) sobre el efecto de incrementar a la corriente de potasio tipo rectificador tardía (IKv) en neuronas simpáticas de rata. Conjuntamente también se encontró que el efecto mencionado es mediado por el receptor a la BK tipo 2.

A continuación, se procedió a descubrir parte de los elementos involucrados y que subyacen al receptor y su efecto mencionado. En primera instancia se procedió a evaluar si dicho receptor esta acoplado a proteínas G ya que se sabe que estos receptores que son del tipo de siete dominios transmembranales, se acoplan a dichas proteínas G, también pueden llegar a tener efectos moduladores que son aparte de este tipo de señalizaciones. Sabiendo pues lo anterior en la figura 14A, se muestra registros de la IKv y el efecto que tiene de estimular con 500 nM de BK, a lo cual en la izquierda se puede apreciar la situación control donde se observa que efectivamente hay un incremento de la corriente por la adición de BK (1 y 2), en comparación al utilizar una solución de registro de la corriente pero conteniendo un inhibidor de las proteínas G, el GDPβs (en ambos experimentos se llevó a cabo una diálisis de 5 minutos para permitir la difusión de fármaco hacia todo el interior de la célula y con esto bloquear a las proteínas G), se puede apreciar que el efecto que tiene la BK sobre la IKv es prácticamente nulo (derecha; 1 y 2) en comparación a la situación control. Este efecto se puede apreciar mejor en la gráfica de barras mostraba en la figura 14B donde claramente se observa en barras negras (control) un incremento de la corriente por la BK de aproximadamente 6 pA/pF; n= 10, contra solo 0.7 pA/pF; n= 9. Claramente se observa la inhibición del efecto de la BK sobre incrementar a la IKv, esto nos indica que el efecto modulador de la BK sobre la IKv es mediado por proteínas G. Sabiendo lo anterior se procedió a continuar a encontrar más de los elementos involucrados y que están por debajo del receptor a la BK tipo 2 y más aún por debajo de las proteínas G.

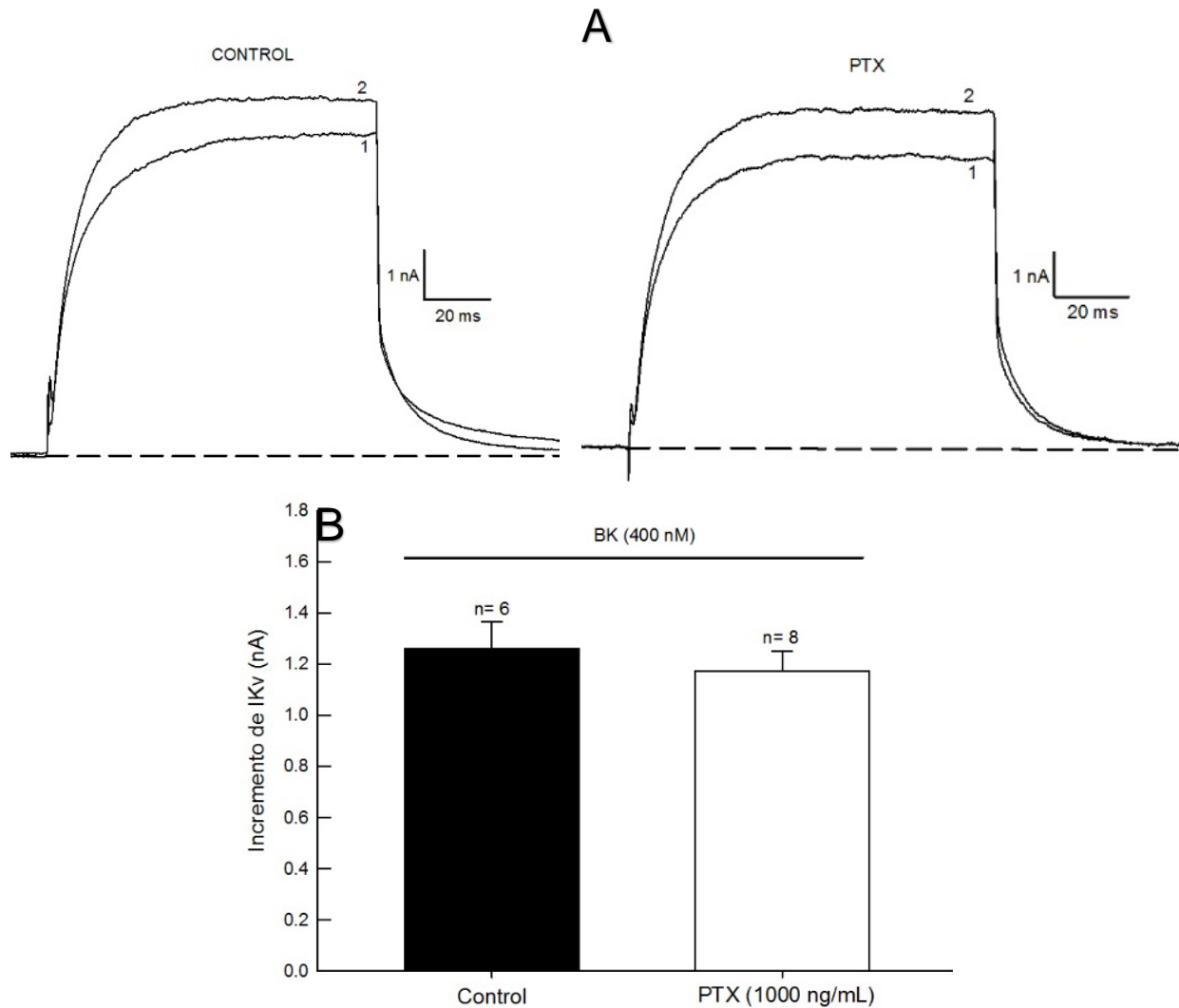


**Figura 14: Efecto del GDPβs, sobre la modulación de la BK sobre la IKv.** En A izquierda tenemos los registros de la IKv después de 5 minutos de diálisis, antes y después de la aplicación de BK 500 nM (1 y 2 respectivamente), se puede apreciar claramente un incremento de la corriente de potasio. En A, derecha los registros de la IKv antes y después de la aplicación de BK 500 nM (1 y 2 respectivamente), sin embargo, con 5 minutos de diálisis de la solución de registro electrofisiológico conteniendo GDPβs, claramente que los registros marcados con 1 y 2 son prácticamente iguales, a lo que se observa que la BK en este caso no produce el aumento de la corriente como se logra apreciar en izquierda de A. Estos incrementos se pueden apreciar más en B donde tenemos que en barras negras, control, el incremento es notable en comparación a las barras blancas que prácticamente no hubo incremento significativo.

De similar manera a los experimentos realizados con la  $ICa_{\text{tipoN}}$  (Figura 7) y una vez que se encontró que el efecto modulador de la BK es mediado por proteínas G, se procedió a evaluar cual proteínas G pudiera estar involucrada, para esto se abordó una de las familias más comunes y descritas en la literatura, la cual es la familias de las proteínas Go/i, también conocida la proteína G que inhibe a la Adenilato ciclasa, la cual a partir de ATP forma AMPc (segundo mensajero por excelencia), para esto se utilizó a la toxina pertusis (PTX), ya que es un bloqueador semi específico de la Go/i. Una vez realizados los cultivos primarios de neuronas simpáticas de rata se procedió a sembrar en pedacitos de vidrio para su adherencia las neuronas, estas fueron separadas en dos grupos, uno control mantenidos con medio de cultivo DMEM adicionado con 6% de suero fetal bovino y el grupo además de tener DMEM y suero fetal bovino, tratado con PTX (1000 ng/mL), ambos grupos fueron incubados a 37 grados centígrados de 12 a 18 horas, una vez realizado esto, se procedió a registrar las neuronas de ambos grupos. Lo observado se puede apreciar en la figura 15 donde en A tenemos los registros característicos de ambos grupos de neuronas control y tratadas con PTX antes y después de la aplicación de BK 400 nM (1 y 2), se puede apreciar a la izquierda de A la situación control donde se observa que después de la adición de BK hay un incremento de la corriente de potasio, de igual manera en A derecha (neuronas tratadas con PTX) se observan incrementos de la corriente de potasio. Lo

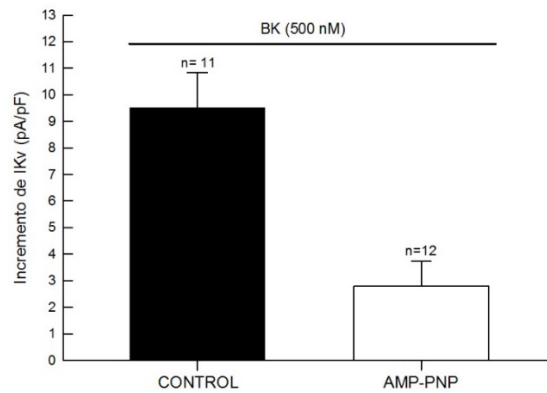


anterior se puede apreciar mejor en la figura 15B donde se muestra que dichos incrementos fueron de 1.25 nA; n=6 y 1.18 nA; n= 8 (barras negras control y barras blancas tratadas por la toxina respectivamente). Este hallazgo nos estaría sugiriendo que el efecto modulador de la BK sobre la IKv, aunque involucra proteínas G al parecer no lo hace o utiliza a la familia de proteínas Go/i. Esto podría ser aceptable ya que algunos péptidos como lo es la modulación de la Angiotensina II (Angio II) sobre la misma corriente, utiliza a la familia Gq/11. Otro hallazgo es que hay reportes donde el receptor a la BK así como el de la Angio II tienen el efecto de mimetizar sus efectos y esto gracias a la dimerización de ambos receptores (receptor de Angio con el de BK y viceversa), sin embargo cabe mencionar que mucho de lo que se conoce con lo que respecta a la modulación de corrientes iónicas neuronales o al menos al ser utilizados neuropéptidos u agonistas muscarínicos utilizan Go/i, de aquí que se hace necesario la comprobación con bloqueadores específicos de Gq/11 para saber o encontrar cual es la proteína G involucrada en esta modulación.



**Figura 15: Efecto de la PTX sobre el efecto modulador de la BK sobre la IKv.** En A se muestran registros característicos de la IKv antes y después de la aplicación de BK (1 y 2 respectivamente) y en el grupo control (izquierda) y tratadas con la toxina pertusis 1000 (ng/ mL) de 12 a 18 horas en incubación (derecha). Se puede apreciar en ambos grupos que la corriente de potasio tipo rectificador tardía, después de la aplicación de BK incrementa de similar manera, tanto para el grupo control como el incubado con PTX. Esto se puede apreciar mejor en el resumen de dichos incrementos. La figura B barras negras (control) tuvo un incremento de aproximadamente 1.25 nA; n= 6, contra 1.18; n= 8 en neuronas tratadas con PTX (barras blancas). Al hacer un análisis de t student, se encontró que en entre los dos grupos no hubo una diferencia significativa  $P \geq 0.5$ .

Una manera fácil de encontrar pistas y con esto saber cuáles son los elementos citoplasmáticos que están involucrados en la modulación de la BK sobre la IKv, es la de llevar a cabo experimentos generales sobre dichas modulaciones y las cascadas de señalización intracelular que están presentes. En relación a lo anterior se sabe que muchos de los elementos citoplasmáticos involucrados en la modulación que subyace a las proteínas G son cinasas, estas requieren de la utilización de algún elemento citosólico de gran importancia, tal cual es el ATP.

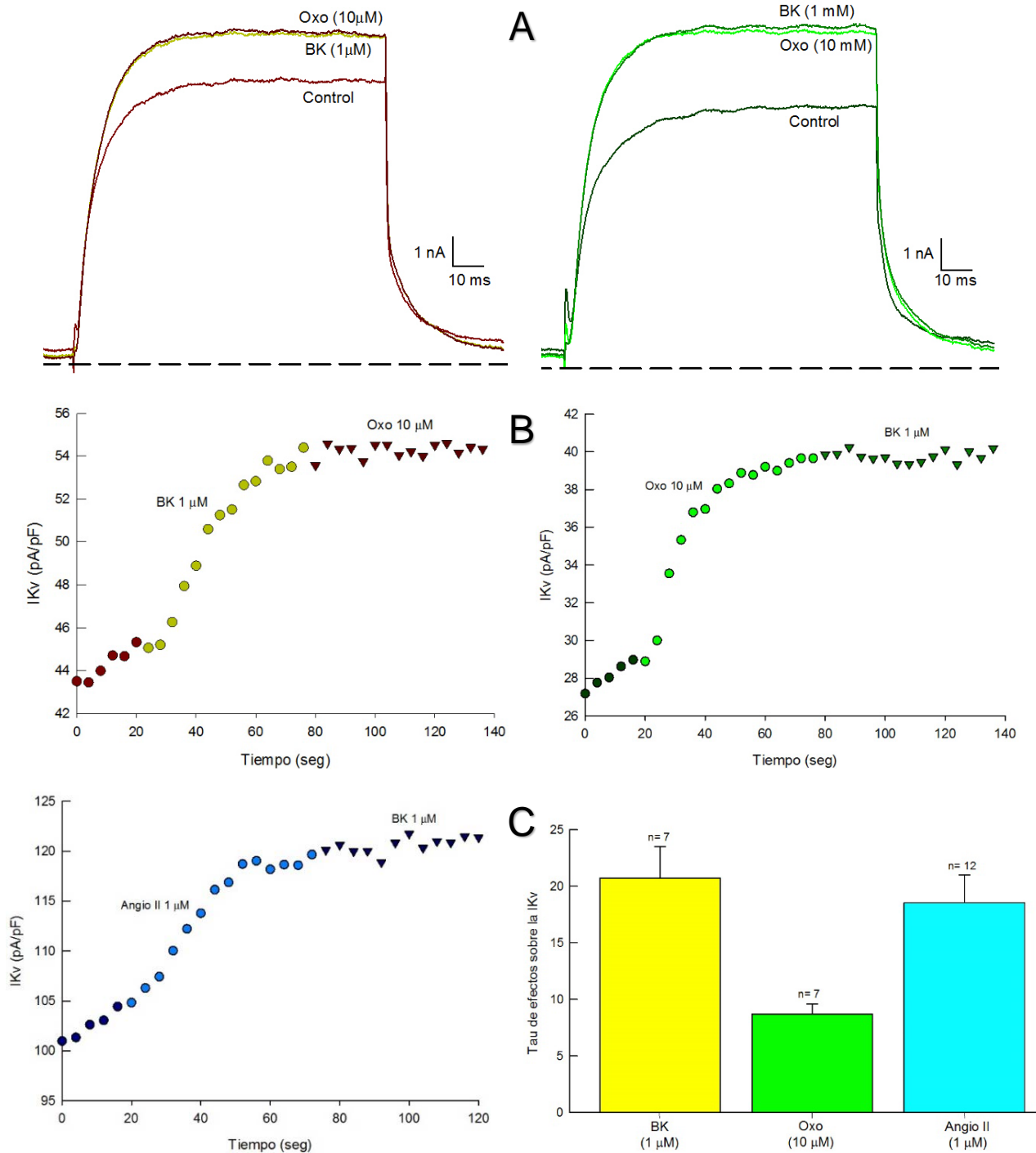


**Figura 16: Efecto del AMP-PNP sobre el efecto modulador de la BK sobre la IKv.** Se muestra el resumen de incrementos de la IKv por BK (500 nM) después de dializar durante 5 minutos. En la situación control se obtuvo un incremento de 9.46 pA/pF y con la diálisis de AMP-PNP y libre de ATP el incremento fue de tan solo 2.67 pA/pF barras negras y blancas respectivamente. Esta diferencia de incrementos entre ambos grupos es notable.

Sabiendo lo anterior, se llevó a cabo el estudio para ver la ausencia del ATP en la modulación de la BK sobre la corriente IKv, para esto se utilizó un análogo no hidrolizable del ATP, el AMP-PNP (ocupa espacios donde se une el ATP, sin llevar a cabo liberación de energía o transformaciones de la misma, en moléculas utilizables en dicha modulación). De tal manera que los resultados se pueden apreciar en la figura 16, se muestra el resumen de incrementos de la IKv por la BK después de dializar 5 minutos tanto en la situación control (barras negras) y a lo cual se encontró un incremento de 9.46 pA/pF; n= 11, con respecto a la situación donde se utilizó solución de registro libre de ATP y conteniendo el análogo no hidrolizable del ATP (AMP-PNP), de este grupo el incremento fue de tan solo 2.67 pA/pF; n= 12 (barras blancas), sin duda un incremento menor y que en comparación al grupo control es estadísticamente significativo. Este hallazgo, aunque muy general nos dice que en la modulación de la BK sobre la IKv es necesario el ATP (modulación ATP sensible), muy probable y a manera de comprobarlo en dicha modulación se encuentren involucrados elementos que requieren de ATP como podrían ser y por citar algunas fosfoquinasas como podrían ser la A y C. Estas se han visto presentes en la modulación de la Angio II sobre la IKv en estas mismas neuronas.

Continuando con el estudio del efecto modulador de la BK sobre incrementar a la IKv se procedió a evaluar en si el efecto de oclusión entre la BK y Oxo-M y la BK y la Angio II esto se puede apreciar en la Figura 17. Se puede apreciar en 17A el registro de la corriente IKv al aplicar la BK y seguido a esto Oxo y viceversa claramente se observa que la aplicación del segundo fármaco no incrementa significativamente a la corriente en ninguno de los dos casos mencionados. Esto pasa igual al aplicar BK y posteriormente Angio II y viceversa primero Angio II y después BK (registros no mostrados). Esto sin duda es un hallazgo importante ya que nos habla que hay un efecto de oclusión y que estos fármacos podrían estar utilizando la misma cascada de señalización y muy probablemente hasta los mismos segundos mensajeros que están por debajo de sus receptores (receptores de Bradiquinina, Muscarínicos y de Angiotensina II). En 17B tenemos el valor de corriente generada por pulsos cada 4 segundos a lo que llamamos curso temporal de la corriente. Los primeros 5 pulsos (control) y después la aplicación de los fármacos mencionados, se puede apreciar de igual manera y claramente el efecto de oclusión. De esta figura (17B) también se puede obtener un dato bastante importante o que puede arrojarnos datos muy útiles, de estos cursos temporales y controlando cuidadosamente la perfusión del fármaco (BK, Oxo-M y Angio II) en cuestión; en nuestro caso la perfusión fue de 3mL/min. Obtuvimos la constante de tiempo tau ( $\tau$ ) que no es más que el tiempo que tarda la estimulación con los fármacos y tener el efecto máximo a la perfusión mencionada para todos los casos. Entonces utilizando una regresión no lineal (Aumento exponencial máximo) del curso temporal una vez que se empieza a aplicar el fármaco obtuvimos la constante mencionada, esto se puede apreciar en la figura 17C derecha. Donde para la

Tau obtenida a partir de BK es aproximadamente 20 seg muy similar o al menos sin diferencia significativa con la Tau obtenida a partir de la Angio II, sin embargo, la Tau obtenida a partir de la Oxotremorina fue menor de 7 seg. Esto nos habla de que las cascadas de BK y Angio II utilizan más elementos de ahí que necesitan más tiempo para llevar a cabo el máximo incremento de la corriente, sin embargo, la Oxo al necesitar menos tiempo podría indicarnos que requiere de menos elementos que subyacen al receptor muscarínico para incrementar la corriente. Esto sin duda nos empieza a portar datos que puedan esclarecernos cuales son elementos involucrados en estos efectos y sobre esta importante corriente de potasio.



**Figura 17: Cursos temporales de la modulación de BK, Oxo-M y Angiotensina II sobre la IKv.** En A tenemos los registros de corriente control y posterior a la aplicación de BK y Oxo, de igual manera BK y Oxo-M. En B y C izquierda se muestra en cada punto la corriente generada cada 4 segundos, los primeros 5 puntos es la corriente control y a partir del sexto la aplicación de los fármacos. En C derecha se muestra los valores de la constante Tau donde se observan valores cercanos a 20 segundos para BK y Angio II y 7 para la Oxo-M

#### IV. Conclusiones

En primera instancia se logró la caracterización de estirpes celulares de cultivo primario de ganglio cervical superior de rata.

El efecto modulador de la BK sobre incrementar a la IKV neuronal es dosis dependiente donde el efecto de incrementar la corriente en un 50% fue de 40.06 nM.

El efecto de la BK – IKv es sensible a la diálisis, esto es a mayor tiempo de diálisis se observó menos efecto de la BK sobre incrementar a la corriente de potasio en cuestión. Esto podría indicarnos que en la cascada de modulación que subyace al receptor de BK se encuentran elementos citosólicos.

El HOE-140, un antagonista de receptor a la BK tipo 2, no permitió en presencia de este, el aumento de la IKv por la BK, indicándonos que este efecto modulador esta mediado por el receptor a la Bradiquinina tipo 2.

El efecto modulador de la BK – IKv es mediado por proteínas G, ya que al dializar en la neurona el inactivador general de proteínas G (GDPβs), no se registró efecto modulador de la BK sobre la IKv neuronal.

La toxina pertusis revirtió el efecto inhibitorio de la noradrenalina sobre la corriente de calcio tipo N de neuronas de ganglio cervical superior de rata, indicándonos la funcionabilidad de esta toxina. A la par de esto el efecto de la Bradiquinina sobre la IKv neuronal de rata es insensible a la toxina mencionada, lo que indica que este efecto modulador BK – IKv no está mediado por proteína Go/i.

El efecto modulador en cuestión fue sensible al ATP, ya que al dializar un análogo no hidrolizable del ATP (AMP-PNP) en ausencia de ATP en la solución de registro electrofisiológico, se observó mucho menos aumento de la IKv por la BK en comparación a la situación control. Esto corrobora la presencia de elementos citosólicos que pudieran ser proteína cinasas.

El efecto modulador de la BK, Angiotensina II y un agonista muscarínico (Oxotremorina M) sobre la IKv tuvo efecto de oclusión, indicando que estos agonistas por sus respectivos receptores están utilizando la o las mismas cascadas de señalización celular en estas neuronas o al menos algunos de los elementos involucrados de estas cascadas. En el mismo sentido al analizar los tiempos de acción de los fármacos mencionados con el incremento de la IKv, se encontró que la constante de tiempo tau fue prácticamente igual en los efectos de BK y Angiotensina II y diferente (mucho mas rápida) la observada con Oxotremorina. Este hallazgo nos dice de manera indirecta que muy probablemente el efecto de la BK sobre la IKv al ser en tiempo muy parecida con la de la Angiotensina II son o utilizan los mismos elementos en las cascadas de señalización, a lo cual se sabe que la Angiotensina II utiliza una proteína Gq/11 y activación de proteína quinasas para la fosforilación del canal IKv y con esto generar el incremento observado y presentado aquí en este reporte.

De igual manera que para los registros se hicieron cultivos primarios de neuronas de ganglio cervical superior de rata, sin embargo, se mantuvieron durante varios días, para el crecimiento de fibroblastos a partir de este ganglio. Se sabe que las neuronas no se dividen o su tasa de división celular es muy lenta y los fibroblastos si, sabiendo que a nuestros cultivos en los medios de mantenimiento no se les puso inhibidor de la división celular, hubo la proliferación de fibroblastos esto tal y cual lo queríamos. Lo que buscábamos era obtener una línea celular de fibroblastos y continuar a futuro con el proyecto de estudio de corrientes iónicas en fibroblastos, datos encontrados y mencionados aquí en este reporte. Los resultados aunque no mostrados aquí fueron que, se ha logrado tener una gran cantidad de fibroblastos a partir de cultivos primarios de ganglio cervical superior, a lo cual se tuvo que limpiar en primera instancia la línea celular de fibroblastos (que solo halla fibroblastos y no neuronas), para esto se procedió a sembrar en cajas y cada 10 días levantar dichas células con tripsina, con esto las neuronas que había fueron muriendo, además de que las neuronas para su mantenimiento durante varias días es necesario suplementar los medios de cultivo con factores neuronales de crecimiento, sin ellos las neuronas poco a poco van muriendo, algunos fibroblastos también murieron pero

como su tasa de división es rápida y además de que no necesitan medios suplementados con neurotrofinas o factores de crecimiento especiales, al cabo de algunas pasadas solo tuvimos fibroblastos. Una vez logrado esto se procedió a congelar a -80 grados centígrados en Dimetil sulfoxido la línea de fibroblastos, para su posterior mantenimiento durante largos periodos de tiempo y además transporte. Esto como mencione servirá para continuar los hallazgos de que el fibroblasto expresa, aunque en menor cantidad a la subunidad KCNQ2, una subunidad que forma canales de potasio y que le confiere al menos en neuronas propiedades de excitabilidad. Sin embargo, no se sabe si dicha subunidad que expresa el fibroblasto sea suficiente para generar corrientes iónicas (futuro proyecto).

**V. Productos de la investigación**

En vías de escritura de manuscrito para mandar a Journal

**PUBLICACIONES**

Anexar evidencias.

**a) Revistas internacionales con arbitraje**

| Autor | Título | Revista | Número | Año | País |
|-------|--------|---------|--------|-----|------|
|       |        |         |        |     |      |
|       |        |         |        |     |      |
|       |        |         |        |     |      |

**b) Memorias en Congresos in extenso con arbitraje**

| Autor | Título | Revista | Número | Año | País |
|-------|--------|---------|--------|-----|------|
|       |        |         |        |     |      |
|       |        |         |        |     |      |
|       |        |         |        |     |      |

**c) Otras revistas**

| Autor | Título | Revista | Número | Año | País |
|-------|--------|---------|--------|-----|------|
|       |        |         |        |     |      |
|       |        |         |        |     |      |
|       |        |         |        |     |      |

**d) Artículos de divulgación**

| Autor | Título | Revista | Número | Año | País |
|-------|--------|---------|--------|-----|------|
|       |        |         |        |     |      |
|       |        |         |        |     |      |
|       |        |         |        |     |      |

**e) Libros**

| Autor | Título | Editorial | Año | País |
|-------|--------|-----------|-----|------|
|       |        |           |     |      |
|       |        |           |     |      |
|       |        |           |     |      |

**f) Capítulos de libro**

| Autor | Título | Editorial | Año | País |
|-------|--------|-----------|-----|------|
|       |        |           |     |      |

|  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |

**g) Otros productos de la investigación como antologías, patentes, prototipos, modelos de utilidad.**

Anexar evidencia como portada e índice de contenido de la antología, o el registro de la patente, prototipo y/o modelo de utilidad.

**h) Formación de recursos humanos**

Anexar copia de la portada de la tesis y del acta de examen como evidencias.

| Nombre | Grado obtenido o avance | Título de la tesis | Departamento |
|--------|-------------------------|--------------------|--------------|
|        |                         |                    |              |
|        |                         |                    |              |

**i) Ponencias presentadas**

Anexar presentación, programa y/o constancia como evidencia.

| Nombre | Fecha | Nacional/Internacional | Título del Trabajo | Memoria |
|--------|-------|------------------------|--------------------|---------|
|        |       |                        |                    |         |
|        |       |                        |                    |         |

**VI. Compromisos adicionales adquiridos al inicio del proyecto**

1. Señale si su proyecto fue sometido a evaluación, a fuentes externas de financiamiento, indicando el organismo financiador. (Anexar documentación comprobatoria, excepto fondos CONACYT). **No aplica**
2. ¿Hubo productos adicionales a los comprometidos? ¿Cuáles? (Anexar evidencias) **Aprendizaje de la técnica de fijación de tejido celular con paraformaldehído, marcaje de este con anticuerpos monoclonales primario y secundario y su observación con microscopia confocal, de esto surgió un nuevo proyecto que próximamente iniciara, sobre la identificación de canales iónicos en células que no son excitables pero que al parecer si presentan canales responsables de la excitabilidad de neuronas.**

**VII. Consistencia entre objetivos y metas (ver punto VIII)**

Utilizar para hacer su autoevaluación el protocolo de inicio de proyecto.

- **Iniciales:**

Objetivo General.

Determinar los elementos involucrados en la cascada de señalización que subyace a la modulación de la IKV neuronal por BK.

Objetivos particulares:

1. Identificar el receptor involucrado en la modulación de IKV neuronal por BK.
2. Identificar si la modulación por BK sobre la IKV neuronal, es mediada por proteínas G.
3. Identificar si el efecto modulador de la BK sobre la IKV neuronal utiliza la vía del AMPc.

4. Analizar si el efecto modulador que tiene la BK sobre la IKV neuronal es sensible al ATP.
5. Analizar si el efecto modulador de la BK sobre la IKV es mediado por Gq/11.
6. Analizar si la modulación de BK sobre la IKV neuronal es mediada por Ca<sup>2+</sup> citosólico.

- **Alcanzados:**

De los objetivos y metas originalmente presentados se logró alcanzar del 1 al 5.

- **Por alcanzar:**

El que no se logró cumplir fue el número parte de 5 y 6

### VIII. Evolución

**Indique el grado de avance de su proyecto en porcentaje a la fecha del llenado de éste formato y contrástelo anexando su programa de actividades o cronograma que realizó en el protocolo para el registro de proyecto de investigación y si no ha cumplido con los tiempos propuestos en el protocolo inicial, explique y enumere las razones que ocasionaron desfases tomando en cuenta las siguientes preguntas:**

El proyecto quedó a un 80% de avance ósea que quedó un 20% aprox. para su culminación total, aun así, con este porcentaje creemos que ya puede ser enviado a su publicación en una revista internacional.

#### CRONOGRAMA

Agosto – Diciembre 2016 En este semestre se realizará la identificación del receptor a la BK involucrado en la modulación de la IKv. Así como si dicha modulación es mediada por proteínas G.

Enero – Junio 2017 Se identificará si la mencionada modulación utiliza la vía del AMPc y con ellos si es dependiente de ATP. También se comenzará con el abordaje de que si en la mencionada modulación pudiera estar mediada por proteína Gq/11 utilizando el péptido GP-2A.

Agosto – Diciembre 2017 Durante este semestre se llevará a cabo la sobreexpresión de la proteína RGS2 (específicos para bloquear señalizaciones donde involucran la proteína Gq/11 mencionada), por técnica avanzada de microinyección intranuclear de neuronas simpáticas. Conjuntamente durante este periodo se llevará exhaustivamente el estudio de ver si en la modulación mencionada se encuentra involucrado el calcio y la naturaleza de este (Intracelular o extracelular).

**En cuanto a lo que reporta de su proyecto considera que:**

**a) ¿Se obtuvieron los objetivos planteados originalmente? (Comente)**

Se logró cumplir 4 objetivos de manera directa, esto es información obtenida de los experimentos, el 5 objetivo se logró de manera indirecta a partir de los experimentos ya que se compararon los resultados obtenidos en varias cascadas ya estudiadas y los tiempos indican que son iguales, sin embargo, quedó de hacerse de manera directa y el objetivo 6 no se logró alcanzar.

**b) ¿Surgieron nuevos problemas no contemplados originalmente? (Comente)**

Por un lado, un problema serio con el material biológico (ratas de experimentación) ya que no se cuenta con un bioterio bien o al menos a la realización de este proyecto, esto sin duda para los experimentos a realizar ya que todo se hace en neuronas de rata.

Por otro lado, con lo que respecta a experimentos se pudo haber hecho un poco más, sin embargo, durante algunos meses hubo problemas con el agua desionizada (calidad de 18.2 MΩ), los experimentos con cultivos

primarios y registro de corrientes iónicas es imprescindible que se use este tipo de agua. El desionizador empezó a dar agua de mala calidad primero de 11 Mega Ohm y ya después de 2 Megas, esto sin duda llevo a acabo que la generación de resultados viables y reproducibles fuera menor, pero esto ya no fue de nuestras manos fue por parte de la infraestructura del laboratorio, además de que hubo grave deficiencias de ratas para continuar con los cultivos de neuronas.

c) ¿La línea de investigación realizada dio lugar o puede dar lugar en el futuro a aplicaciones, patentes, modelos de utilidad, prototipos, etc.? (Comente).

Generación de conocimiento básico esto es esclarecer cómo funcionan diferentes fármacos en sistemas excitables y con esto encontrar evidencia de cómo se lleva a cabo las funciones de tejidos órganos y sistemas y su integración en un organismo completo.

#### **IX. Comentarios adicionales**

Ninguno

**Dr. en C Eduardo Ivan Acosta Gomez**

---

Nombre y firma del investigador responsable del proyecto

**\*\*Nota:** Para informe final deberá entregarse anexa la documentación comprobatoria correspondiente.

El original de éste formato es para la CIP y la copia de recibo sellada se entrega al Investigador responsable del proyecto.