



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**Efecto del cambio en el pH extracelular sobre las
corrientes iónicas de las células aisladas del vestíbulo
de la rata**

Tesis

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta

LBM Francisco Salvador Mercado Aca

Tutor principal:
Dr. Enrique Soto Eguibar

Abril de 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) POR EL APOYO QUE ME BRINDÓ PARA REALIZAR MIS ESTUDIOS EN EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS MEDIANTE LA BECA No. 184450.

AGRADEZCO A LA DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POR EL COMPLEMENTO DE BECA QUE ME BRINDÓ DURANTE MIS ESTUDIOS DE DOCTORADO.

*Para Angélica mi esposa, por todo el amor y apoyo que me brinda
Para María y Francisco mis padres, que sin ellos no lo hubiera logrado
Para Marco mi hermano, por su compañía y consejo
A todos ellos muchas gracias*

ÍNDICE

Resumen	2
Introducción	3
<i>Transducción mecanoeléctrica</i>	4
<i>Potencial receptor y liberación del neurotransmisor</i>	7
<i>pH extracelular</i>	9
<i>Canales sensibles a la concentración extracelular de protones (ASICs)</i>	10
<i>Activación, desensibilización y recuperación de la desensibilización</i>	12
<i>Selectividad iónica</i>	15
<i>Farmacología</i>	16
<i>Otras corrientes sensibles a pH</i>	19
<i>Papel fisiológico de los ASIC</i>	20
<i>Miembros de la familia ENaC/DEG en el oído interno</i>	22
<i>Modulación de la descarga aferente en el vestíbulo por pH extracelular</i>	23
Planteamiento del problema	25
Hipótesis	25
Objetivos	26
Material y métodos	27
<i>Disociación celular: células ciliadas</i>	27
<i>Disociación y cultivo de neuronas aferentes</i>	28
<i>Registro electrofisiológico (fijación de voltaje)</i>	29
<i>Protocolos de fijación de voltaje</i>	29
<i>Protocolos farmacológicos</i>	30
<i>Histología e inmunohistoquímica del oído interno</i>	31
Resultados	33
<i>Corriente activada por protones en las células ciliadas</i>	33
<i>Corriente activada por protones en las neuronas aferentes</i>	34
<i>Farmacología de la corriente activada por protones en las neuronas aferentes</i>	37
<i>Efecto de amilorida y cambios de pH en fijación de corriente</i>	41
<i>Inmunohistoquímica</i>	42
Discusión	45
<i>Características biofísicas</i>	45
<i>Características farmacológicas</i>	47
<i>Inmunohistoquímica del oído interno</i>	49
<i>Papel fisiológico</i>	50
Conclusión	53
Bibliografía	54
Apéndice	66

RESUMEN

Desde el desarrollo de los conceptos de medio interior y de homeostasis se ha considerado que ciertos parámetros fisiológicos varían en un rango muy restringido y algunos de ellos, como el pH, están regulados por sistemas redundantes de amortiguadores y bombas de membrana por lo que para fines prácticos su variabilidad es casi nula, a pesar de que ciertos compartimentos tanto intra (mitocondrias, vesículas sinápticas) como extracelulares (estomacal) pueden tener pHs diferentes al del plasma que es prácticamente neutro.

Sin embargo, se ha demostrado que debido a lo reducido del espacio extracelular y a las características complejas de los procesos de difusión en medios no homogéneos, es posible que haya variaciones importantes de pH en ciertos compartimentos y micro regiones del organismo. El hallazgo de receptores ionotrópicos específicos para protones (H^+), y su localización principalmente en las membranas postsinápticas de las neuronas del sistema nervioso central de diversas especies ha llevado a postular a los H^+ como mediadores en la comunicación intercelular. Previamente determinamos que la función del órgano vestibular de vertebrados es sensible a cambios de pH extracelular (Vega y cols., 2003). El objetivo del presente trabajo de tesis fue determinar si las células excitables del órgano vestibular de mamífero (células ciliadas y neuronas aferentes vestibulares) presentan corrientes iónicas activadas específicamente por cambios en el pH extracelular, y definir el papel que estas corrientes tienen en la fisiología del vestíbulo.

El efecto de cambios en el pH extracelular fue evaluado en las células aisladas del órgano vestibular de la rata con la técnica de control de voltaje y de corriente en la configuración de célula completa. Las células ciliadas (tanto tipo I como II) no mostraron cambio en la corriente registrada al voltaje de mantenimiento cuando la perfusión se cambió de la solución con pH fisiológico (pH = 7.4) a una solución con pH = 5.5 ($V_H = -90$ mV para las tipo I y $V_H = -60$ mV para las tipo II). Por otro lado, en un subgrupo de neuronas aferentes vestibulares de diámetro somático y capacitancia pequeña, el cambio a pH extracelular ácido (pH < 7) activó una corriente iónica entrante acarreada principalmente por iones sodio; esta corriente incrementó su magnitud en función de la concentración extracelular de protones y se encontró completamente activada a pH ≈ 5.5 . La corriente activada por protones mostró una cinética de activación rápida y una desensibilización casi completa con un curso temporal que se ajustó con una función exponencial simple. La corriente fue modulada por la concentración extracelular de calcio y fue sensible al bloqueo del diurético amilorida, gadolinio, plomo y el ácido acetil salicílico. El neuropéptido FMRF-amida y el zinc en altas concentraciones incrementaron la corriente activada por protones. Por las características electrofisiológicas y farmacológicas antes mencionadas se dedujo que esta corriente fue acarreada a través de canales ASIC (por sus siglas en inglés *Acid Sensing Ionic Channels*). Las neuronas que presentaron los ASIC dispararon potenciales de acción cuando el pH extracelular se modificó a 6.1, los cuales fueron inhibidos con amilorida. Para determinar qué subunidades conformaban los ASIC expresados en las neuronas aferentes vestibulares se realizó inmunohistoquímica de fluorescencia utilizando anticuerpos específicos para las distintas subunidades. Se encontró la expresión de las subunidades ASIC 1a, 2a, 2b, 3 y 4 en los cuerpos neuronales del ganglio vestibular, mientras que para la subunidad ASIC 1b no se observó inmunofluorescencia. Adicionalmente la expresión de la subunidad 1a y 2a fue localizada en las terminales nerviosas que inervan el epitelio sensorial del sistema vestibular. Las neuronas inmunoreactivas fueron medidas y su capacitancia fue estimada, encontrándose que este parámetro fue similar a la capacitancia medida electrofisiológicamente en las neuronas que presentaron funcionalmente ASICs.

El patrón de expresión restringido a una subpoblación del ganglio vestibular sugiere que los ASIC participan en la generación de los patrones de descarga de potenciales de acción de las neuronas que los presentan, ya sea incrementando su entrada sináptica por acumulación de protones provenientes de vesículas sinápticas o modulando la respuesta de los receptores a aminoácidos excitadores que se reconocen como los neurotransmisores en la sinapsis entre las células ciliadas y las neuronas aferentes.

INTRODUCCIÓN

El sistema vestibular funciona como un sistema de navegación inercial, contribuyendo con información relativa a las aceleraciones a que es sometida la cabeza, con base en lo cual se generan los reflejos vestibulo-oculares y vestibulo-espinales relacionados con la estabilización de la mirada y el mantenimiento de la postura. A nivel superior y con la integración de información visual y propioceptiva contribuye a la percepción de la posición del cuerpo en el espacio y el desplazamiento del sujeto en su entorno, generando un marco de referencia para la actividad motora coordinada (Young, 1984).

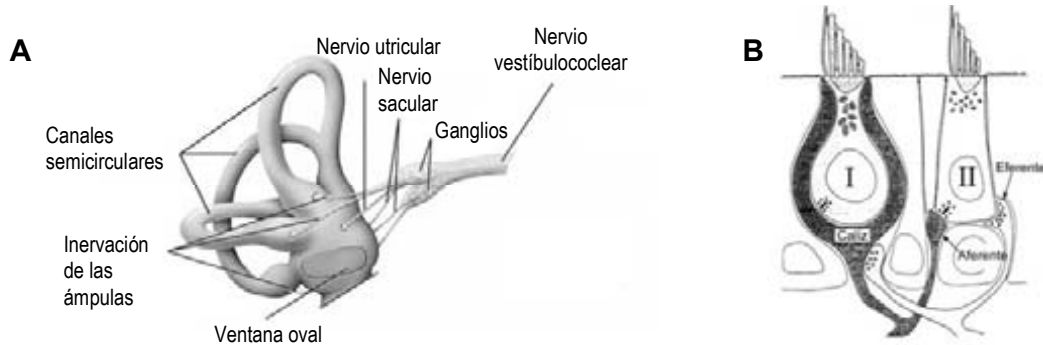


Figura 1. Esquema del aparato vestibular y las células ciliadas vestibulares. En A, aparato vestibular humano, se indica la inervación de cada uno de los órganos vestibulares. En B, esquema de las células ciliadas tipo I y II. Las células ciliadas tipo I son de forma redondeada y están inervadas por una terminal aferente que les rodea en toda su porción basolateral formando un cáliz. La neurona eferente hace sinapsis sobre la aferente. Las células tipo II, son de forma predominantemente cilíndrica y reciben inervación tanto aferente como eferente en forma de botones sinápticos.

Las células ciliadas constituyen la unidad funcional básica de los órganos auditivo, vestibular y de la línea lateral (Fig. 1) (Anniko, 1988). Estas células receptoras especializadas se encuentran localizadas en cada uno de los epitelios sensoriales del vestíbulo formando las máculas de los órganos otolíticos y las crestas de los canales semicirculares. En los mamíferos existen dos tipos de células ciliadas que se distinguen por su forma, sus propiedades electrofisiológicas y por las características de su terminal sináptica aferente (Guth y cols., 1998) (Fig. 1B).

Ambos tipos celulares poseen en su región apical un haz de cilios (por el cual reciben su nombre); la superficie de membrana basolateral en el caso de las células ciliadas tipo I está cubierta casi en su totalidad por el telodendrón de la neurona aferente, mientras que en las células ciliadas tipo II la superficie basolateral está en contacto principalmente con células de soporte y hacen contacto sináptico en forma de botón con neuronas aferentes y eferentes (Fig. 1B). Estas diferencias sólo las encontramos en mamíferos, aves y reptiles, en todos los demás vertebrados el epitelio sensorial de los órganos vestibulares sólo cuenta con células ciliadas tipo II. Las células ciliadas están bañadas por dos líquidos extracelulares distintos en su composición iónica, en su parte apical (al interior del órgano vestibular) por un líquido denominado endolinfa

que tiene una alta concentración de potasio y baja concentración de sodio, semejante a la composición del líquido intracelular. En su parte basolateral, las células ciliadas están bañadas por la perilinfa, que es un líquido extracelular convencional, con una alta concentración de sodio y baja de potasio (Young, 1984).

Las deflexiones de los estereocilios de las células ciliadas activan el aparato mecanotransductor, generando un cambio de potencial eléctrico en la célula sensorial, el cual, a su vez, determina la liberación del neurotransmisor aferente y la subsecuente activación de las neuronas aferentes vestibulares que, junto con las neuronas auditivas, forman el octavo par craneal.

Transducción mecanoeléctrica

Los estereocilios en las células ciliadas están distribuidos de manera uniforme sobre la superficie del epitelio; cada cilio se encuentra rodeado de otros 6 cilios a la misma distancia y van incrementando su tamaño en forma regular, ubicándose los de longitud mayor cerca del kinocilio y los menores en la parte opuesta (Fig. 2a-c). Cabe aclarar que el kinocilio es el único cilio verdadero, que contiene el arreglo típico 9+2 de filamentos de tubulina, mientras que los estereocilios son microvellosidades y su esqueleto es de un arreglo denso de la proteína actina. La posición del kinocilio le confiere al aparato mecanotransductor polarización funcional, ya que deflexiones de los estereocilios en dirección del kinocilio generan una corriente iónica que despolariza la célula sensorial y posteriormente la liberación del neurotransmisor.

Entre los estereocilios fueron descubiertas estructuras filamentosas que unen la punta de un estereocilio con la pared de otro inmediatamente superior (Fig. 2b y 2c), estas pequeñas estructuras fueron denominadas uniones de punta (*tip links*) y su integridad es dependiente de la concentración extracelular de calcio e indispensable para la generación de la corriente de transducción mecanoeléctrica (*MET* por sus siglas en inglés) (Pickles y cols., 1984; Assad y cols., 1991). Se propuso inicialmente que estas estructuras eran las responsables de abrir los canales de MET uniéndose directamente a ellos en la punta del estereocilio más corto (donde harían contacto con el canal de MET). Así, cuando se lleva a cabo el movimiento del haz de cilios (en dirección del kinocilio) el aparato mecanoeléctrico es sometido a un estiramiento que produce la apertura del canal de MET. A esta teoría se le conoce como la *apertura de resorte* (o *gating spring*) debido a que cuando estas estructuras (las paredes de los cilios, el *tip link* y el canal de MET) son sometidas a un estiramiento debía necesariamente haber un elemento elástico que impidiera la ruptura de este sistema de acople mecanoeléctrico (Fig. 2d) (Pickles y Corey, 1992). Sin embargo, estudios posteriores sugieren que estas uniones de punta en realidad son estructuras rígidas formadas por la cadherina 23 y la protocadherina 15 y que presentan un arreglo helicoidal. Las cadherinas son moléculas de adhesión dependientes de calcio de la matriz extracelular, las mutaciones en cadherina 23 o protocadherina 15 en humanos causan el

síndrome de Usher, caracterizado por sordera congénita, disfunción vestibular y retinitis pigmentosa; en ratones, causan desorganización del haz de cilios de las células ciliadas, por lo que también presentan una hipoacusia severa asociada con alteraciones de la función vestibular (Lêfevre y cols., 2008). El ión calcio produce que la cadherina se pliegue en forma globular aumentando su rigidez (Kazmierczac y cols., 2007), por lo que, aunque esta proteína sea necesaria como parte del *gating spring*, este elemento no es el que mantiene las características de resorte. Estudios posteriores han sugerido que el mismo canal de MET es el elemento elástico del *gating spring* (ver adelante).

Las propiedades biofísicas y farmacológicas del canal de MET de diferentes especies animales se han estudiado detalladamente y sus características generales son: conductancia alta (100 a 300 pS), poro de conducción catiónico no selectivo (hay consenso de que el Ca^{2+} es el ión más permeable, aunque en condiciones fisiológicas el K^+ es el ión responsable mayoritariamente de la corriente de mecanotransducción, esto debido a la composición iónica peculiar de la endolinfa) y es bloqueado de manera no selectiva por amilorida y aminoglucósidos en el rango micromolar bajo (Crawford y cols., 1991; Corey y Hudspeth, 1979; Jorgensen y Ohmori, 1988;

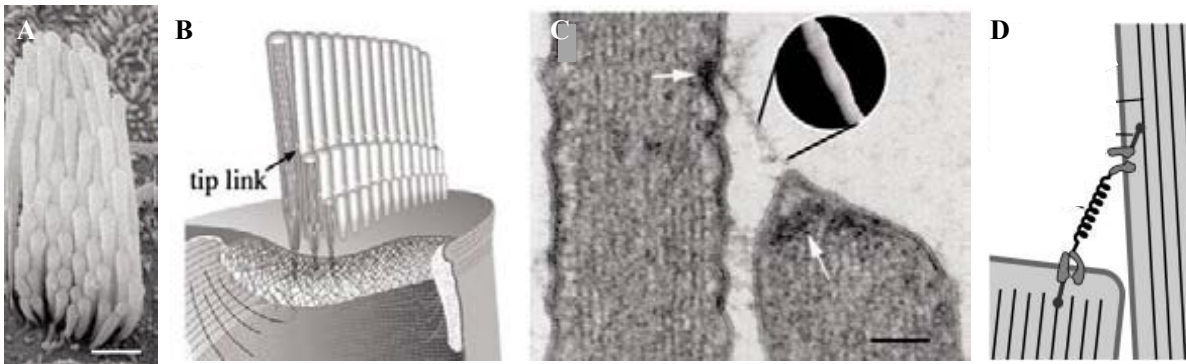


Figura 2. El haz de cilios de las células ciliadas del órgano acústico-vestibular. En A un haz de cilios de una célula ciliada vestibular. En B vista lateral de un haz de cilios, la flecha muestra una unión de punta. En C micrografía electrónica de transferencia en la que se muestra una vista lateral de una unión de punta entre dos cilios y en el recuadro, una reconstrucción computacional de dicha unión en donde se observa un entrelazado de 2 o 3 fibras de modo helicoidal. En D esquema del modelo del *gating spring* en el cual el elemento elástico es la unión de punta (Tomado y modificado de Ricci y cols., 2006 y Holt y Corey, 2000).

Rusch y cols., 1994). Desde su descubrimiento y debido a que la proteína que forma el canal de MET es escasa, su identidad molecular ha sido un enigma. Varios candidatos se han propuesto y estudiado con métodos farmacológicos y genéticos; la evidencia muestra que en vertebrados el MET podría ser de la familia de canales iónicos del Transient Receptor Potential (TRP), lo cual fue inferido debido a que estos canales comparten muchas características biofísicas con los de MET. Particularmente, el TRPA1 contribuiría formando parte del canal de MET en mamíferos (Corey y cols., 2004), lo cual fue sugerido debido a que la inhibición de la expresión del TRPA1

con oligonucleótidos morfolinos en células ciliadas del ratón reduce la corriente de MET y a que la proteína de este canal (detectada con anticuerpos específicos) fue encontrada únicamente en la punta de los cilios. Sin embargo, el ratón transgénico que carece del canal TRPA1 (desarrollado por dos distintos grupos de trabajo) tiene una función auditiva y vestibular normal, y sus corrientes de MET y las respuestas auditivas del tallo cerebral no muestran ninguna diferencia a las del ratón silvestre. De estos resultados se concluye que aunque el TRPA1 pudiera estar involucrado en la formación del canal de MET, esta proteína no es esencial para el proceso de transducción mecanoeléctrica o bien, que el modelo de ratón transgénico sufre un cambio adaptativo en su expresión genética que permite compensar la ausencia del gen (Bautista y cols., 2006; Kwan y cols., 2006). En el pez cebra y en anfibios existen evidencias experimentales sólidas que muestran que el canal de mecanotransducción de las células ciliadas en parte está formado por el canal TRPN1. Shin y cols. (2005) muestran en *Xenopus* que este canal se encuentra en la punta de los cilios de las células ciliadas de la línea lateral, del órgano acústico-vestibular y de las células ciliadas epidermales, mientras que Sidi y cols. (2003) en el pez cebra, demuestran que inhibiendo la expresión funcional del TRPN1 (con oligonucleótidos morfolinos) se abaten por completo los potenciales micrófonos de las células ciliadas de la línea lateral así como la captura del colorante FM1-43 (el poro de conducción del canal de MET es suficientemente amplio como para permitir el paso de moléculas relativamente grandes como el colorante FM1-43 [peso molecular = 611.55 Da]). Sin embargo, se piensa que este canal no está relacionado con la corriente de MET en vertebrados superiores debido a que en mamíferos no se ha encontrado un gen ortólogo al TRPN1.

Los TRP de varios subtipos cuentan con repetidos de anquirina en su extremo amino terminal, siendo estos sitios de unión al citoesqueleto especialmente abundantes en los subtipos N1 y A1 (29 y 17 respectivamente). El modelaje molecular de estas proteínas muestra que las propiedades elásticas de repetidos de anquirina sometidos a una fuerza de estiramiento similar a la que es sometido el aparato mecanoeléctrico auditivo y vestibular durante la estimulación natural reproduce las propiedades elásticas y mecánicas de los estimados biofísicamente para el *gating spring* de diferentes células ciliadas (Sotomayor y cols., 2005). Estos resultados, junto con aquellos que demuestran que los *tip links* son elementos relativamente rígidos, hacen pensar que el elemento elástico del *gating spring* es el canal de mecanotransducción por sí mismo, y que este elemento es el segmento largo amino terminal del TRPN1 o TRPA1 (Howard y Bechstedt, 2004; Sotomayor y cols., 2005).

Potencial receptor y liberación del neurotransmisor

En su membrana basolateral, la célula ciliada (tanto tipo I como tipo II) presenta canales iónicos de K⁺ dependientes de voltaje y en la zona de liberación del neurotransmisor canales de Ca²⁺ activados por voltaje. Una vez que se lleva a cabo el proceso de transducción mecanoeléctrica,

la corriente generada produce un cambio de voltaje que activa a los canales de Ca^{2+} acoplados con la liberación de neurotransmisor y diversos canales de K^+ que producen una repolarización de la célula receptora.

Las células ciliadas se caracterizan por contar con una baja o nula densidad de canales de Na^+ dependientes de voltaje, los cuales son prominentes durante la etapa embrionaria para luego desaparecer poco después del nacimiento (Masetto y cols., 2003; Marcotti y cols., 2003; Chabbert y cols., 2003; Wooltorton y cols., 2007). Por lo anterior, la principal corriente despolarizante de las células ciliadas es la de MET. Tanto las células tipo I como las tipo II expresan distintas corrientes de K^+ entre las que se encuentran una corriente transitoria de K^+ sensible a 4-aminopiridina (4-AP), un rectificador tardío sensible a tetraetilamonio (TEA^+), una corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} , entre otras (Guth y cols., 1998). Adicionalmente, las células tipo I expresan predominantemente una conductancia al K^+ que tiene un umbral de activación bajo denominada g_{KL} , la corriente que se genera pasa por canales KCNQ y HERG y le confiere un potencial de membrana casi idéntico al potencial de inversión del K^+ y una baja resistencia de entrada (Hurley y cols., 2006).

La sinapsis entre la célula sensorial (ciliada) y la neurona aferente vestibular es de tipo listón (*ribbon type synapse*). Una de las principales características de esta sinapsis es la disponibilidad de una gran reserva de vesículas de neurotransmisor lista para ser liberada de manera dependiente de Ca^{2+} . Lo anterior se correlaciona con la resolución temporal que requiere el procesamiento de la información auditiva, vestibular y visual (órganos en los que los receptores sensoriales establecen este tipo de sinapsis con sus neuronas aferentes primarias) (Nouvian y cols., 2006; Moser y cols., 2006).

Las neuronas del ganglio vestibular constituyen una población heterogénea en cuanto a sus propiedades intrínsecas, tamaño, marcadores bioquímicos y a su patrón de inervación (Goldberg, 2000). Las neuronas de diámetro somático grande tienen axones gruesos e inervan con terminales en forma de cáliz a las células ciliadas tipo I; se caracterizan por presentar una descarga irregular de potenciales de acción y tienen como marcador bioquímico a la calretinina. Por otro lado, las neuronas de diámetro somático menor inervan con terminales en forma de botón a las células ciliadas tipo II, presentan una descarga eléctrica regular y tienen como marcador bioquímico a la periferina. Las neuronas más abundantes son un grupo con diámetro somático intermedio y que forman contactos sinápticos con las células ciliadas tanto en forma de botón como en forma de cáliz, por lo que se les conoce como neuronas dimórficas. Se ha podido determinar que su marcador bioquímico es la calbindina (Goldberg, 2000; Leonard y Kvetter, 2002).

Actualmente está claro que, al igual que en otros sistemas sensoriales, el neurotransmisor entre las células ciliadas y las neuronas aferentes es un amino ácido excitador (AAE), probablemente el glutamato, y que actuaría postsinápticamente a través de receptores NMDA y

no NMDA (Fig. 3), aunque sobre las neuronas del ganglio espiral el cual inerva la cóclea, sólo se encontraron receptores no NMDA (Soto y Vega, 1988; Soto y cols., 1994; Eybalin, 1993; Guth y cols., 1998; Glowatski y Fuchs; 2002; Dayanithi y cols., 2007). Sobre las neuronas aferentes vestibulares aisladas y mantenidas en cultivo primario se reportó el incremento en la concentración intracelular de calcio ante la aplicación de glutamato, ácido kaínico y AMPA; dichos incrementos fueron antagonizados por CNQX lo que sugiere la entrada de calcio por canales tipo AMPA, probablemente a través de las subunidades AMPA GluR2/GluR3 que se sabe son permeables al ión Ca^{2+} (Dayanithi y cols., 2007). Por otra parte, existen vías de control eferente sobre la entrada aferente que participan en la regulación de la ganancia de la aferencia vestibular. La sinapsis en las vías eferentes (SNC-vestíbulo) tiene como neurotransmisor principal a la acetilcolina (Goldberg y Fernández, 1980; Pérez et al., 2008). Se ha descrito también la participación de otros sistemas de neuromoduladores como el óxido nítrico (Flores y cols., 1996, 2001), péptidos opioides (Andrianov y Ryzhova, 1999; Vega y Soto, 2003), histamina, ATP (Guth y cols., 1998; Soto y cols., 2001), entre otros.

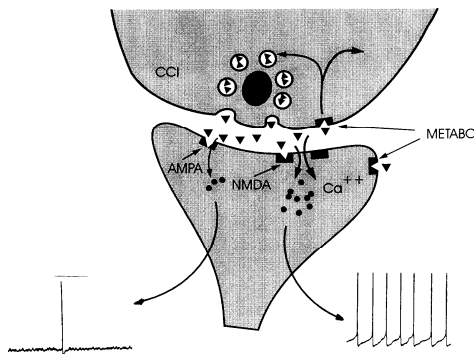


Figura 3. Diagrama de la sinapsis de una célula ciliada con una neurona aferente vestibular. Sobre la dendrita aferente se localizan receptores para aminoácidos excitadores (AAE). Se ha demostrado que esta vía involucra receptores de tipo ionotrópico, principalmente tipo AMPA y NMDA; evidencia menos sólida sugiere también la presencia de receptores a AAE de tipo metabotrópico. La activación de receptores tipo NMDA genera trenes de potenciales de acción como el que se muestra, en tanto que la activación de receptores AMPA genera respuestas fásicas.

pH extracelular

Desde el punto de vista funcional, el efecto de cambios de pH extracelular puede ser muy importante, ya que parece claro que las vesículas que contienen glutamato tienen una alta concentración de H^+ (pH = 5.7; Miesenböck y cols., 1998), lo que las convierte en una fuente endógena de liberación sináptica de los mismos. Se ha observado que la actividad sináptica intensa promueve cambios transitorios del pH extracelular; por ejemplo, en rebanadas de hipocampo, la activación de las colaterales de Schaffer produce un cambio rápido de pH, inicialmente acidificando el medio extracelular (~10 ms) e inmediatamente después ocurre una alcalinización de mayor duración (Krishtal y cols., 1987). También se ha propuesto que el espacio sináptico puede acidificarse intensamente debido a la presencia de intercambiadores Na^+/H^+ en la membrana presináptica, lo cual fue demostrado en la unión neuromuscular de

Caenorhabditis elegans, en donde se encontró que dicho intercambiador (pbo-4) acidifica el espacio sináptico y que el incremento en la concentración de H^+ activa canales ionotrópicos en la membrana postsináptica (Beg y cols., 2008). Cabe mencionar que antes del trabajo de Beg y cols., en el 2008, la única demostración de que los H^+ actuaban a nivel sináptico como neurotransmisores o neuromoduladores provenía del trabajo de DeVries (2001). Él encontró que en la sinapsis (que por cierto es en forma de listón) entre los conos y la neurona bipolar de la retina de ardilla, los protones liberados de las vesículas de neurotransmisor (en este caso glutamato) inhiben a los canales de calcio tipo L presinápticos, lo que evita la entrada de calcio de manera consecutiva entre dos estímulos muy próximos en el tiempo ($\tau = 157$ ms); esta retroalimentación negativa en su momento fue interpretada como un nuevo mecanismo de modulación para la liberación del neurotransmisor (DeVries, 2001). Trabajos posteriores hicieron hincapié en la importancia de mantener la integridad del espacio sináptico para que la neuromodulación ocurriera (Palmer y cols., 2003). Adicionalmente también se describió que esta retroalimentación negativa sólo ocurría entre conos y neuronas bipolares y no entre los bastones y las neuronas bipolares (Hosoi y cols., 2005).

Actualmente se conocen distintos tipos de receptores, tanto ionotrópicos como metabotrópicos, que tienen como ligando a los H^+ . Los canales iónicos ASIC (*Acid Sensing Ion Channel*), los pbo-5 y pbo-6 de la familia “cys-loop” y los TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*) son activados por descensos en el pH extracelular (Reeh y Kress, 2001; Beg y cols., 2008). Por otro lado, Ludwig y cols., en el 2003 mostraron que el receptor 1 de cáncer de ovario acoplado a proteína G actúa como sensor de H^+ y promueve la formación de inositol trifosfato intracelular.

Por otra parte, se ha demostrado que cambios en el pH extracelular modulan distintos tipos de receptores ionotrópicos neuronales como: los purinérgicos (Stoop y cols., 1997), los de acetilcolina (Abdrakhmanova y cols., 2002), los de ácido gama amino butírico ($GABA_A$) (Krishek y Smart, 2001), ácido alfa-amino-isoxasole-propiónico (AMPA) (Ilhe y Patneu, 2000) y N-metil-D-aspartico (NMDA) (Tang y cols., 1990; Traynelis y Cull-Candy, 1990). Además, se ha observado que los cambios en el pH extracelular también modifican corrientes iónicas activadas por voltaje. Este último efecto ha sido evaluado principalmente sobre las corrientes iónicas presentes en el músculo de mamífero, por ejemplo: sobre los canales KCNQ1 (Peretz y cols., 2002), los canales K_v 1.5 y K_v 1.4 (Kehl y cols., 2002; Claydon y cols., 2000), la subunidad Kcnk3 de los canales de K^+ de dos poros (Lopes y cols., 2001), la corriente de Ca^{2+} de alto y bajo umbral (Tytgat y cols., 1990; Shah y cols., 2001; DeVries, 2001), la corriente de K^+ activada por Ca^{2+} (Laurido y cols., 1991), la subunidad HERG (Anumonwo y cols., 1999), entre otras.

Con base en la multiplicidad de acciones que afectan la excitabilidad celular, los protones extracelulares han sido propuestos como mensajeros de comunicación intercelular, particularmente como neuromoduladores (Waldmann y Lazdunski, 1998; Traynelis y Chesler, 2001; Bianchi y Driscoll, 2002) y potencialmente como neurotransmisores (Beg y cols., 2008).

Canales sensibles a la concentración extracelular de protones (ASICs)

Krishtal y Pidoplichko reportaron en 1981 la presencia de una conductancia catiónica activada por H^+ en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal de la rata. En los últimos diez años los canales sensibles a H^+ fueron clonados y denominados genéricamente como ASIC. Las subunidades que componen estos canales fueron clonadas por su homología con los miembros de la familia ENaC/DEG (Epithelial Sodium Channel/Degenerin) (Fig. 4). Comparten la propiedad de formar canales principalmente permeables al ión sodio y de ser bloqueados por el diurético amilorida y sus derivados, con excepción de ASIC1a, que se ha observado que también es permeable de manera sustancial al calcio y ASIC1a y 1b a los protones mismos (Waldmann y cols., 1997; Waldmann y Lazdunski, 1998; Kellenberger y Schild, 2002; Chen y Grunder, 2007). Se han identificado 4 genes que codifican para los ASICs, de los cuales se han clonado 6 subunidades que se conocen como: ASIC1a (Waldmann y cols., 1997), ASIC1b (Chen y cols., 1998), ASIC2a (Price y cols., 1996), ASIC2b (Lingueglia y cols., 1997), ASIC3 (Waldmann y cols., 1997b) y ASIC4 (Grunder y cols., 2000). Por mucho tiempo se pensó que los canales de la familia ENaC/DEG se ensamblaban en tetrámeros, ya que la evidencia bioquímica más sólida así lo sugería (Coscoy y cols., 1998); sin embargo, recientemente se determinó la estructura de un canal ASIC1a mutante clonado de los ganglios de la raíz dorsal del pollo por cristalografía de rayos X, y ahora sabemos con certidumbre que los canales de la familia ENaC/DEG incluyendo los ASICs son trímeros, con una estructura peculiar ya que carecen de un vestíbulo evidente por el cual los iones puedan pasar del modo en el que lo hacen en otros canales (Jasti y cols., 2007) (Fig. 4). Como analogía, se ha propuesto que desde el punto de vista de su estructura tridimensional, el enorme segmento extracelular de cada subunidad (de ≈ 370 aminoácidos) tiene la forma de una mano (Fig. 6) y los canales funcionales se ensamblan como homo o heteromultímeros de prácticamente cualquier combinación entre ellos. Dependiendo de las subunidades que conforman el canal sus propiedades cinéticas y farmacológicas varían (Benson y cols., 2002; Hesselager y cols., 2004). Lo anterior es válido para todas las subunidades menos para ASIC2b y ASIC4, ya que como homómeros no forman canales iónicos activados por H^+ . Sin embargo, cuando ASIC2b se ensambla con alguna otra subunidad influye en la cinética y propiedades de conducción del canal (Lingueglia y cols., 1997). Para ASIC4 no se había demostrado que formara heteromultímeros (Grunder y cols., 2000; Akopian y cols., 2000; Hesselager y cols., 2004), aunque recientemente se ha mostrado que ASIC4 interactúa con ASIC1a y ASIC3 reduciendo su densidad en la membrana plasmática

por medio de un sitio de ubiquitinización que ubicado en el extremo amino terminal de ASIC4, lo que finalmente reduce la corriente de otros ASIC cuando se coexpresa con ASIC4 (Donier y cols., 2008). También se ha visto que los ASIC pueden formar heterómeros con las proteínas ENaC (α , β , γ y δ), esta observación fue hecha con la técnica de FRET e inmunoprecipitación evaluando a las distintas subunidades ENaC en combinación con ASIC1a. Estas interacciones más que generar canales constitutivamente abiertos generan canales activados por protones con nuevas propiedades biofísicas, y con una selectividad iónica y sensibilidad farmacológica con cambios significativos y muy novedosos dentro de la familia ENaC/DEG (Meltzer y cols., 2007). Debido a que las subunidades ASIC y ENaC son coexpresadas por varios tipos celulares no sería raro que se formaran canales híbridos en células de mamífero.

Los ASICs se encuentran distribuidos ampliamente tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico (principalmente sobre las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal), excepto las subunidades ASIC3 y ASIC1b que se expresan únicamente en el sistema nervioso periférico (Waldmann y cols., 1997; Walddman y Lazdunski, 1998; Chen y cols., 1998).

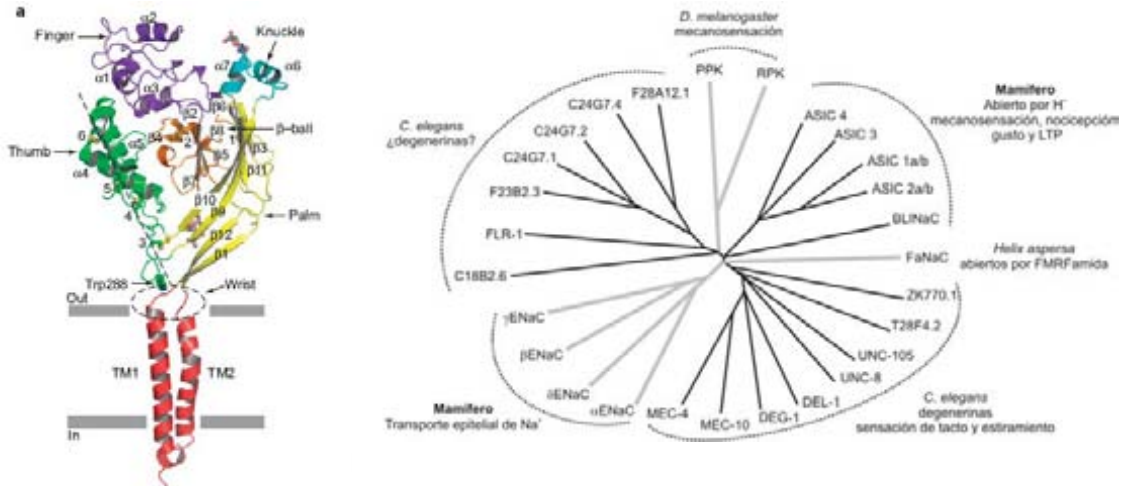


Figura 4. Miembros de la familia de canales ENaC/DEG (derecha) y esquema representativo de una de las cuatro subunidades que conforman los canales funcionales (izquierda). Las subunidades que forman estos canales típicamente tienen dos segmentos transmembranales, el amino y carboxilo terminal cortos e intracelulares y un gran segmento extracelular. Abreviaturas: ENaC = canal epitelial de Na⁺, UNC y MEC = degenerinas; FaNaC = canal de Na⁺ activado por FMRF-amida; PPK = canal de Na⁺ Pickpocket de *Drosophila*; RPK = canal de Na⁺ Ripped Pocket de *Drosophila* (Tomado y modificado de Bianchi y Drischoll, 2002 y de Jasti y cols., 2007).

Activación, desensibilización y recuperación de la desensibilización

El paso de iones a través de canales ASICs genera una corriente que tiene una cinética de rápida activación y desensibilización parcial. Los parámetros biofísicos que caracterizan a los ASICs son: su sensibilidad a los H⁺ extracelulares, la constante de tiempo de la desensibilización (τ_{desen}), el porcentaje de corriente resistente a la desensibilización y la constante de tiempo de la recuperación de la desensibilización (τ_{recup}). Para las subunidades clonadas hasta hoy en día se conocen muy bien los primeros dos parámetros, tanto para los homo- como para los heteromultímeros (Waldmann y Lazdunski, 1998; Benson y cols., 2002; Hesselager y cols., 2004). Quizá la conductancia unitaria del canal es el único parámetro en el que coinciden de manera más o menos consistente todas las subunidades y es de entre 10-15 pS (Kellenberger y Schild, 2002).

De la curva de sensibilidad a pH se obtiene el pH al cual se genera la mitad de la corriente (pH_{0.5}) y su pendiente, y esta información da una idea muy próxima acerca de las subunidades que conforman el canal en estudio.

En relación a la activación (*gating*) de estos canales, se ha propuesto que los ASICs son canales constitutivamente abiertos, pero se encuentran bloqueados por un ión calcio, y que los H⁺ abren el canal porque compiten por el sitio de unión a calcio (Fig. 5A) (Immke y McCleskey, 2003).

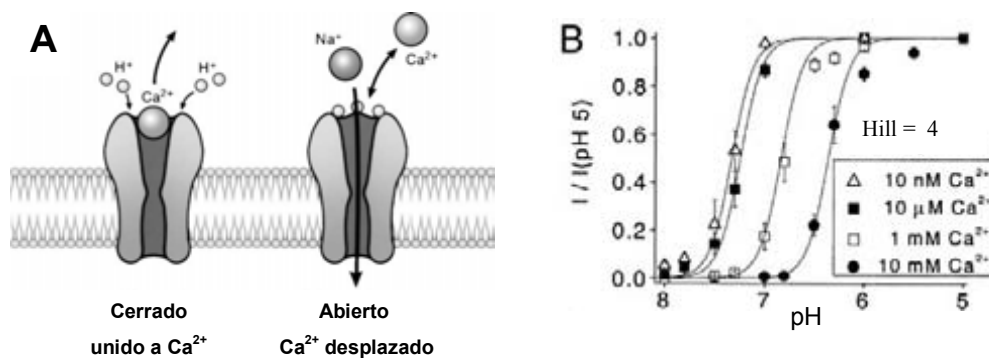


Figura 5. En A se esquematiza el mecanismo probable de bloqueo de poro abierto por parte del Ca^{2+} sobre ASIC3. A la izquierda se muestra el canal a pH 7.4 con el Ca^{2+} unido en la boca del poro, a la derecha, se muestra el canal después de ser expuesto a pH ácido, se observa como los protones desplazan al Ca^{2+} fuera del poro y permite el paso de iones a través de él. En B se muestra la curva de sensibilidad al pH de ASIC3 a diferentes concentraciones de Ca^{2+} extracelular. Como puede observarse las distintas curvas difieren en su EC_{50} pero no cambian su pendiente ($H = 4$), lo que sugiere que tanto el Ca^{2+} como los protones compiten por un mismo sitio receptor en el canal (Tomado y modificado de Immke y McCleskey, 2003).

De este modelo se deduce que un incremento o decremento en la concentración extracelular de Ca^{2+} tiene un efecto directo en la curva de sensibilidad a los H^+ , en donde el incremento del Ca^{2+} extracelular reduce la sensibilidad de los ASIC por los protones y viceversa (Fig. 5B). Posteriormente se vió que este modelo es insuficiente para explicar la apertura de otras subunidades que no sean ASIC3. Por ejemplo, para ASIC1a se ha encontrado que tiene dos sitios de unión a Ca^{2+} , uno de alta y otro de baja afinidad, y la ausencia de dichos sitios no modifica la apertura por H^+ del canal ni su sensibilidad a ellos (Paukert y cols., 2004). También se describieron en el asa extracelular del canal 4 aminoácidos (residuos de ácido aspártico y glutámico, muy conservados en todas las subunidades ASIC) que afectan determinantemente el *gating* del canal, cualquiera de estas mutaciones reduce su sensibilidad a los H^+ de manera significativa, lo que hace pensar que la apertura de los ASIC es más compleja e implica cambios conformacionales, cuando menos para ASIC1a (Paukert y cols., 2008).

El bloqueo por calcio se ha vuelto una herramienta en la caracterización de las respuestas mediadas por ASICs, ya que permite diferenciarlas de las otras corrientes iónicas activadas por protones (TRPV1) que son acarreadas principalmente por iones calcio. De la estructura del cristal de ASIC1 se ha deducido que hay cuando menos 4 probables sitios de unión a protones (*acidic pocket*), si estos sitios los comparte o no con Ca^{2+} a pH 7.4 aún no ha sido determinado, ya que el cristal se logró conseguir a un pH menor a 7, por lo que se piensa que este canal está en estado desensibilizado (Jasti y cols., 2007). Sin embargo, la sustitución de dos aminoácidos de los sitios de unión a protones más sobresalientes (neutralización de residuos de Asp sustituidos por Asn) tiene profundos efectos en el *gating* del canal, reduciendo la sensibilidad a protones y corroborando la importancia de estos residuos para el sensor de pH (Jasti y cols.,

2007). Se cree que la apertura de los ASIC involucra un cambio conformacional en el que los dominios extracelulares del canal se ven modificados una vez que el canal es expuesto a pH ácido (Fig. 6) (Jasti y cols., 2007). Aunque especulativo, este modelo no discrepa completamente de la evidencia electrofisiológica presentada en los últimos años; el modelo propone que los dominios de los dedos y pulgar del ASIC se encuentran coordinados por uno o más iones Ca^{2+} probablemente estabilizando el estado cerrado del canal, y que esta interacción se ve alterada cuando el pH extracelular desciende, lo que produce el movimiento de uno de los segmentos extracelulares abriendo una vía de permeación para los iones. Adicionalmente, se ha propuesto que el dominio de la palma también debe tener algún tipo de movimiento debido a que ahí se han localizado aminoácidos titulables indispensables para la activación del canal. Cuáles son los aminoácidos que están involucrados directamente en la unión al calcio y los protones se encuentra aún en debate (Jasti y cols., 2007; Paukert y cols., 2008).

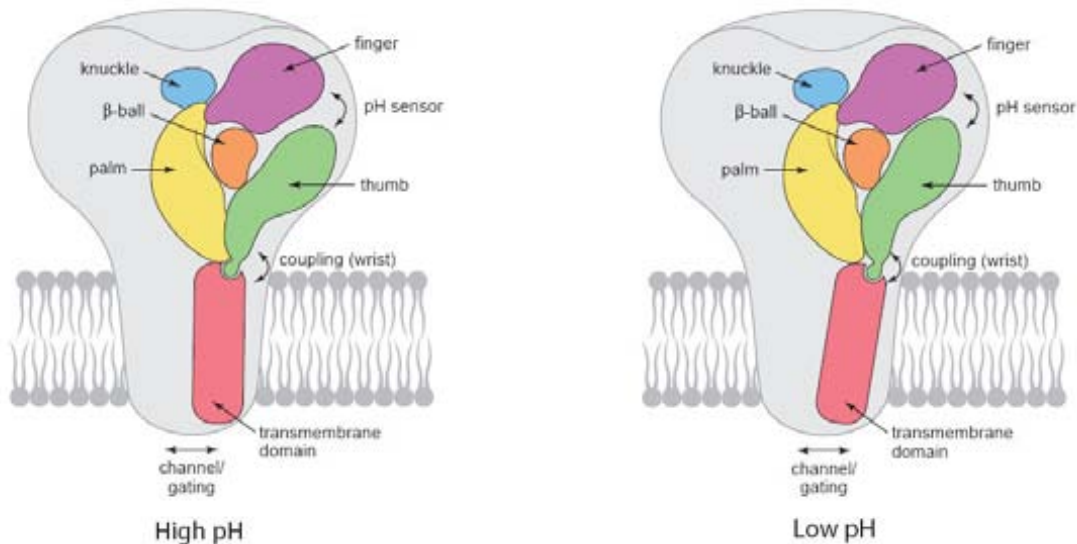


Figura 6. Esquema del mecanismo de apertura (*gating*) de los canales ASIC. El estado cerrado es de alta afinidad por el Ca^{2+} , al aumentar la concentración extracelular de protones éstos desplazan al Ca^{2+} de su o sus sitios de unión, y pasa al estado abierto cuando se ligan los protones y se desliga el Ca^{2+} del canal. En presencia de H^+ el canal sufre una transición adicional hacia un estado desensibilizado. Al aumentar el pH el canal se cierra nuevamente. Debido a este mecanismo de apertura las transiciones entre estado cerrado y abierto ocurren con una cinética sumamente rápida. Modificado de Jasti y cols., 2007.

La τ_{desen} generalmente se calcula de una corriente iónica generada al $\text{pH}_{0.5}$, y se ajusta una función exponencial a la fase de caída de la corriente. Por reportes previos, dicha constante muestra una dependencia al pH, siendo más rápidas las τ_{desen} de corrientes generadas a pHs más cercanos al fisiológico y más lentas las generadas a pHs más ácidos (Hesselager y cols., 2004).

Por último, el parámetro menos estudiado es la recuperación de la desensibilización, y se debe principalmente a la dificultad técnica que conlleva, sin embargo, en los trabajos donde se ha analizado (por ej. Immke y McCleskey, 2003), se observa un comportamiento monoexponencial de la recuperación de la desensibilización de los homomultímeros.

Selectividad iónica

Todos los miembros de la familia ENaC/DEG comparten la propiedad de ser permeables principalmente al ión sodio, por lo que el potencial de inversión de la corriente se encuentra muy cercano al de dicho ión (Kellenberger y Schild, 2002). Los ENaCs discriminan fuertemente entre cationes divalentes y monovalentes, incluso, sólo cationes monovalentes pequeños atraviesan el poro del canal (Na^+ , Li^+), de tal modo que el K^+ queda casi imposibilitado para atravesarlo ($P_{\text{Na}}/P_{\text{K}} > 100$). Para los ASICs no es tan rigurosa la discriminación entre cationes monovalentes, se ha demostrado cierta permeabilidad al K^+ en todas las subunidades ASICs ($P_{\text{Na}}/P_{\text{K}} \sim 3-10$; Kellenberger y Schild, 2002). Solamente la subunidad ASIC1a muestra una permeabilidad significativa al Ca^{2+} ($P_{\text{Na}}/P_{\text{Ca}} = 2.5$; Waldmann y cols., 1997) y a los H^+ ($P_{\text{H}}/P_{\text{Na}} \approx 5$; Chen y Grunder, 2007), y se ha encontrado que puede incrementar los niveles de Ca^{2+} intracelular en las células, tanto nativas como transfectadas (Yermolaieva y cols., 2004). La permeabilidad de ASIC1a se ha estudiado comparándola con su variante de *splicing* ASIC1b que es muy selectiva para cationes monovalentes ($P_{\text{Na}}/P_{\text{Ca}} > 100$; Bässler y cols., 2001). El análisis de la secuencia primaria de ambas proteínas muestra la mayor diferencia en la porción amino-terminal, antes del primer segmento transmembranal. Mediante quimeras en donde se intercambian los amino-terminales de ASIC1a y ASIC1b, se observó que cuando ASIC1b (normalmente impermeable a Ca^{2+}) tenía el amino-terminal de ASIC1a se volvía permeable a Ca^{2+} , y viceversa, la subunidad ASIC1a con el amino-terminal de ASIC1b es impermeable a Ca^{2+} . De estos resultados se concluyó que la porción amino-terminal de ASIC1a es la responsable de la permeabilidad a Ca^{2+} . Aunque resulta complicado imaginarse geoméricamente cómo el extremo intracelular de la proteína participa en el filtro de selectividad (Bässler y cols., 2001). Adicionalmente, para obtener el cristal de la proteína ASIC1a lamentablemente fue necesario cortar los extremos amino y carboxilo intracelulares, por lo que estas porciones de la proteína no fueron visualizadas en la estructura de cristal, debido a lo anterior no se puede deducir nada sobre la permeabilidad a Ca^{2+} de ASIC1a y tampoco de ningún otro ión ya que el poro del canal desensibilizado parece colapsado (Jasti y cols., 2007).

Farmacología

En los últimos años se ha incrementado significativamente el número de herramientas farmacológicas con las cuales estudiar a los ASICs. El agonista de todas las subunidades son los

H⁺, y su antagonista inespecífico es la amilorida (que cuenta con un sitio de unión, un solo aminoácido situado en la boca del poro) (Waldmann y Lazdunski, 1998). Entre las diferentes subunidades existe una sensibilidad diferenciada tanto a los H⁺ como a la amilorida, siendo ASIC3 la más sensible a los H⁺ (pH_{0.5} = 6.7), y ASIC1a la más sensible a la amilorida (IC₅₀ = 10 μM). La subunidad menos sensible a los H⁺ es ASIC2a (pH_{0.5} = 4.4), y la subunidad menos sensible a la amilorida es ASIC3 (IC₅₀ = 60-100 μM) (Tabla I; Kellenberger y Schild, 2002). En 2006, Pidoplichko y Dani, mostraron que los canales ASIC de las neuronas de la sustancia nigra pars compacta del ratón (que son casi exclusivamente ASIC1a) eran activados por el ión amonio (NH₄⁺), y dicha apertura fue inhibida por bloqueadores selectivos de ASIC1a. Este hallazgo fue sorprendente ya que se creía a los protones como los únicos agonistas de estos canales, aunque la EC₅₀ muestra una muy baja afinidad del canal por el ión NH₄⁺ (EC₅₀ ≈ 20 – 40 mM) (Pidoplichko y Dani, 2006).

Tabla I

	pH _{0.5}	Amilorida IC ₅₀ μM	Gadolinio IC ₅₀ μM	FMRFamida EC ₅₀ μM	Neuropéptido SF EC ₅₀ μM	Ac. Acetil Salicílico IC ₅₀ μM
ASIC 1a	6.2	10	-	~ 33	-	s/efecto
ASIC 1b	5.9	21	-	-	-	s/efecto
ASIC 2a	4.4	28	> 1000	s/efecto	-	s/efecto
ASIC3	6.7	63	~ 50	-	~ 50	~ 100

(-) = no determinado

Por otro lado se ha estudiado el efecto del zinc (Zn²⁺), ya que este metal se encuentra altamente concentrado en algunas vesículas sinápticas (en rango μM) del sistema nervioso central y puede potencialmente ser coliberado con los protones y el neurotransmisor, de este modo, en ciertas condiciones competiría por el sitio de unión de los protones (algún residuo aminoácido titulable como la histidina). Se ha encontrado que el Zn²⁺ tiene un efecto paradójico sobre las corrientes ASIC. A concentraciones bajas bloquea con alta afinidad a las subunidades ASIC1a, y ASIC1a+2a (IC₅₀ ~10 nM) (Chu y cols., 2004); mientras que a concentraciones altas (EC₅₀ ~ 100 μM) coactiva a ASIC2a y ASIC1a+2a (Baron et al., 2001).

También se ha estudiado el efecto del gadolinio (Gd³⁺) como bloqueador de los ASICs. El Gd³⁺ es un bloqueador conocido de mecanotransductores, así como también lo son otros lantánidos; debido a que los ASICs están relacionados estrechamente con las degenerinas (DEG) en su secuencia primaria, se pensó que los ASIC podrían también ser susceptibles al bloqueo por Gd³⁺ así como lo son las DEG (Kellenberger y Schild, 2002). Se ha demostrado así que el Gd³⁺ es un bloqueador relativamente potente de ASIC3 y del heteromultímero ASIC2a+3 (ambos IC₅₀ ~ 50 μM), y tiene una menor eficacia sobre homomultímeros de ASIC2a (Babinski

y cols., 2000). Otros metales pesados que se ha observado bloquean a los ASICs son el plomo, cobre, cadmio y níquel (Wang y cols., 2006; Staruschenko y cols., 2006; Wang y cols., 2007). El plomo (Pb^{2+}) inhibe de manera específica a las variantes de *splicing* del gen ASIC1, también son sensibles los heterómeros que contengan ASIC1a ($IC_{50} \approx 3 \mu M$), mientras que los canales que contienen subunidades 2a, 2b y 3 sin ASIC1a son pobremente bloqueadas por el Pb^{2+} ; los autores sugieren que este bloqueo es independiente del sitio de unión a calcio y amilorida, sin embargo, datos obtenidos en nuestro laboratorio indican la posibilidad de que el Pb^{2+} interactúe con el sitio de unión a Ca^{2+} de los ASIC con mayor afinidad que el ión Ca^{2+} y que un bloqueo de estado cerrado sea el mecanismo por el cual este ión neurotóxico inhiba la corriente ASIC (Garza, 2007). Lo anterior es pensado debido a que en diversos sitios proteicos de unión a cationes divalentes (sitios de unión a Ca^{2+} o Zn^{2+} en enzimas, canales de calcio, calmodulina, dedos de zinc, etc.), el Pb^{2+} se une con mayor afinidad que el ión nativo (ya sea Ca^{2+} o Zn^{2+}), ocupando el sitio activo interrumpiendo la actividad de la proteína, lo cual puede explicar la alta toxicidad del Pb^{2+} (Garza y cols., 2006). Por un mecanismo similar creemos que el Pb^{2+} actúa en el sitio de unión a Ca^{2+} de los ASIC. Otros metales pesados de interés toxicológico como lo es el cadmio y níquel también inhiben a los ASIC (Staruschenko y cols., 2006). El Ni^{2+} bloquea a ASIC1a sin afectar a las subunidades 1b, 2a, 2b y 3 con una IC_{50} de 600 μM , mientras que el Cd^{2+} bloquea a ASIC2a y 3 sin afectar a ASIC1a con una IC_{50} de 1 mM. El cobre también inhibe corrientes nativas de ASICs en la corteza cerebral e hipocampo de ratas neonatas en forma dependiente de la concentración con una IC_{50} de 50 μM (Wang y cols., 2007).

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES, ej. ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno) son inhibidores reversibles o irreversibles de la ciclo-oxigenasa II (COX-II). Debido a que los ASICs se expresan en neuronas nociceptivas, la acción de los AINES fue estudiada sobre las corrientes acarreadas a través de ASICs en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (Voilley y cols., 2001). Los AINES inhibieron estas corrientes iónicas, algunos de ellos afectando el componente sostenido y otros la respuesta rápida al pico. Los autores que documentaron la inhibición que producen los AINES sobre los ASIC especulan que independientemente de su efecto sobre la COX-II, el hecho de que éstos fármacos bloqueen a los ASIC puede constituir, cuando menos en parte, una explicación del efecto analgésico y anti-inflamatorio de estas sustancias, sobretodo cuando se aplican de manera tópica (Voilley y cols., 2001).

Vale la pena destacar que se han descrito dos toxinas peptídicas con efecto selectivo sobre ASICs. La toxina 1 aislada del veneno de la tarántula *Psalmopoeus cambridgei* (PcTx1), es un potente y específico bloqueador de los homomultímeros de ASIC1a ($IC_{50} = 0.9 \text{ nM}$; Escoubas y cols., 2000). El mecanismo por el cual esta toxina bloquea a ASIC1a es peculiar, ya que al unirse al canal en un amplio sitio de unión (Salinas y cols., 2006), la toxina incrementa la afinidad por los protones a pH 7.4, debido a esto el canal pasa de estado cerrado a

desensibilizado y una vez que el canal se expone a una solución ácida ya no se observa ninguna corriente (Chen y cols., 2005, 2006). Por otro lado, la toxina 2 de la anémona marina *Anthopleura elegantissima* (APT_{x2}) inhibe a la subunidad ASIC3 y a canales que contienen a esta subunidad combinada con alguna otra (IC₅₀ de 63 nM a 2 μM) (Diochot y cols., 2004).

En neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (GDR), el fármaco A-317567 (C-{6-[2-(1-Isopropil-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolin-7-yl)-ciclopropil]-naftalen-2-yl}-metanediamine) bloquea de manera inespecífica a las subunidades ASIC (Dube y cols., 2005). En este trabajo se observó que este compuesto tiene una potencia 10 veces mayor comparado con la amilorida (IC₅₀ = 2-30 μM). La virtud de este fármaco es que parece interactuar muy poco con los ENaC.

Por último, un canal iónico de la familia de los ENaC/DEG el FaNaC, que es activado por el neuropéptido FMRF-amida tiene una gran homología en la secuencia de aminoácidos con los ASICs. Además, los péptidos relacionados en los mamíferos (Neuropeptido-FF y Neuropeptido-SF) tienen un papel modulador de las respuestas nociceptivas uniéndose a sus receptores acoplados a proteínas G (Panula y cols, 1999). Por esto se pensó que se pudiera modificar la respuesta de los ASICs por la FMRF-amida. Se encontró que tanto la FMRF-amida como los neuropéptidos relacionados incrementan significativamente la corriente sostenida de los ASICs, así como la excitabilidad de las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (Askwith y cols., 2000; Deval y cols., 2003). La FMRF-amida tuvo su efecto potenciador sobre las subunidades ASIC1a, 1b y 3 sin presentar efecto sobre la subunidad 2a (Askwith y cols., 2000). Curiosamente, los heteromultímeros ASIC1b-ASIC3 son significativamente más sensibles a la FMRF-amida y los péptidos relacionados que cualquiera de las otras combinaciones posibles de ASIC1a, 1b y 3 incluyendo los homomultímeros (Chen y cols., 2006b). Estos resultados han dado pie a relacionar estrechamente a los ASICs con la nocicepción.

Otras corrientes sensibles a pH

El canal iónico que es el prototipo de nociceptor es sin duda el TRPV1 (o VR1, receptor vainilloide 1). Su clonación ha permitido su estudio detallado y se ha descrito que es activado por distintas señales potencialmente nociceptivas, entre otras por pH < 6 (Caterina y cols., 1997; Tominaga y cols., 1998). En neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (GRD), la activación de este receptor eventualmente contamina las corrientes iónicas mediadas por ASICs, ya que se distribuyen en el mismo tipo de neuronas. Lo anterior se puede evitar ya que el umbral de activación de los ASICs y de los TRPV1 por los H⁺ difiere en órdenes de magnitud, con excepción de ASIC2a cuyo umbral es similar al del TRPV1. Además, se cuenta con bloqueadores específicos de los TRPV1, como lo son la capzacepina y la iodoresiniferatoxina que en concentraciones adecuadas no afectan a los ASICs y bloquean a los TRPV1 (Szallasi y Blumberg, 1999; Wahl y cols., 2001).

Los canales de K^+ de dos poros (4TMD-2P; Robbins, 2001) del tipo TASK (Two pore-domain Acid Sensitive K^+ channel), han sido descritos como el correlato molecular de corrientes de fuga sensibles a acidez (para revisiones recientes ver Lesage y Lazdunski, 2000; Patel y Honoré, 2001; Patel y Lazdunski, 2004). La sensibilidad a pH de las subunidades TASK1 y TASK3 se encuentra muy cercana al pH fisiológico, y cuentan con una farmacología muy bien caracterizada en donde sus agonistas son los anestésicos volátiles halotano e isoflurano, y son inhibidas por acidosis, anandamida y el rojo rutenio. La mayor parte de los canales de esta familia son bloqueados por el Ba^{2+} ($\approx 200 \mu M$). Estos canales son resistentes al bloqueo por tetraetilamonio (TEA) y la 4-aminopiridina (4-AP). Además, reciben una importante modulación negativa por parte del receptor muscarínico M3 que opera a través de proteínas tipo Gq.

En el oído interno, existen reportes de canales de K^+ de dos dominios de poro. Por un lado, en la cóclea de ratas y ratones empleando RT-PCR e inmunohistoquímica se ha detectado la presencia del canal TWIK-1 pero no la expresión de TWIK-2 (Nicolas y cols., 2003). En contraste, otro grupo de trabajo detectó en la cóclea de ratón por PCR e inmunoblotting al canal TWIK-2 (Mhatre y cols., 2004; Popper y cols., 2008). Aun así, ambos trabajos coinciden en que los receptores no se localizan sobre las células sensoriales, sino más bien en las células oscuras (TWIK-1) y en la estría vascularis (TWIK-2), pudiendo participar en la reabsorción de la endolinfa.

Recientemente en invertebrados y organismos unicelulares se han descritos canales ionotrópicos que tienen como ligando a los protones, dichos canales difieren en su estructura de los ASIC o de los TRP, ya que pertenecen a la familia Cys-Loop, son catiónicos inespecíficos y se cree que al igual que los demás canales de la familia cada subunidad tiene cuatro segmentos transmembrana y cada canal está compuesto por 5 subunidades. Se clonaron 2 subunidades provenientes del *C. elegans*, denominadas pbo-5 y pbo-6 y cuando son expresados en sistemas heterólogos los protones los activan con un $pH_{0.5}$ de 6.8 con una cinética de activación y desensibilización similar a la de los ASICs (Beg y cols., 2008). En la bacteria *Gloebacter violaceus* fue identificado otro receptor ionotrópico para protones (GLIC), al igual que pbo-5 y pbo-6 éste es miembro de la familia Cys-Loop. El $pH_{0.5}$ de GLIC es de 5.1, este receptor fue cristalizado y su estructura fue determinada por difracción de rayos-X; se consiguió obtener el cristal del canal en estado abierto donde se visualizó su poro y filtro de selectividad (ya que el canal no desensibiliza ante la exposición prolongada de pH ácido) (Bocquet y cols., 2007; Bocquet y cols., 2009; Hilf y Dutzler, 2009).

Papel fisiológico de los ASIC

Con los años, las funciones atribuidas a los ASICs se han ampliado; inicialmente se les relacionó con la nocicepción (Krishtal y Pidoplichko, 1981; Waldmann y cols., 1997; Reeh y Kress, 2001), y se sugirió que participan en la percepción del sabor ácido (Lin y cols., 2002). Otra modalidad sensorial en la cual se ha podido relacionar la participación de los ASICs es en el tacto, como mecanotransductor. Esta función muy probablemente esté desligada a la de sensor de protones, posiblemente se deba a la similitud en la secuencia primaria entre los ASIC y las DEG que son propiamente mecanotransductores. Los autores, al evaluar esta modalidad sensorial postularon que los ASIC mantenían algunas de las funciones de mecanotransductor. Encontraron que los ratones knockout de los canales ASIC2a y ASIC3 presentan una disminución en la sensación táctil (Price y cols., 2000; Price y cols., 2001). Posteriormente, Allen y Attwell (2002) describieron por primera vez que el estiramiento de la membrana celular produce un incremento significativo de la corriente ASIC cuando es activada por protones, sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado que las deformaciones de la membrana produzcan una apertura directa de los ASIC.

Uno de los hallazgos más consistentes es el de la participación de la subunidad ASIC3 en la percepción del dolor originada por la isquemia cardiaca (Sutherland y cols., 2001). También se ha encontrado que el bloqueo de ASIC1a con PcTx1 (administrada vía intra cerebro ventricular) o inhibiendo su expresión (con nucleótidos antisentido) produce analgesia tanto a nivel periférico bloqueando a ASIC1a (efecto agudo), como a nivel central a través de la activación de los receptores μ y δ opioides (efecto crónico) (Mazzuca y cols., 2007). Lo anterior se debe a que previniendo la activación de ASIC1a los niveles de expresión de Met-enkefalina se ven incrementados por un mecanismo celular desconocido; dicho efecto analgésico mediado por opioides no ocurre en ratones que carecen del gen de la proencefalina cuando se bloquea a ASIC1a, pero sí en ratones que carecen de otros péptidos que son relacionados con la analgesia (proopiomelacortina, prodinorfina y taquiquinina) (Mazzuca y cols., 2007).

Se ha postulado que la presencia de los ASICs en el SNC, específicamente en hipocampo y corteza (Baron y cols., 2002) sería importante en condiciones de isquemia (Onho y cols., 1989), ya que descensos en el pH incrementan la dinámica de disparo de las neuronas que padecen el insulto isquémico. Se ha demostrado que realmente la subunidad ASIC1a participa directamente en la fisiopatología de la isquemia en el sistema nervioso central (Xiong y cols., 2004), ya que el área de daño inducida por la oclusión de la arteria media cerebral se reduce significativamente en el ratón *knockout* de ASIC1a con respecto al silvestre, así como con la microinyección intra cerebro ventricular de amilorida (concentración final estimada 100 μ M), o de PcTx1 (concentración final estimada 50 ng/ml), lo que indica que la muerte neuronal es, al menos en parte, producida por fenómenos secundarios a la activación de los ASICs por el cambio de pH extracelular característico de la hipoxia. También se demostró que la subunidad ASIC1a participa en la fisiopatología de la esclerosis múltiple; se observó que los ratones

knockout de la subunidad ASIC1a muestran una mejoría marcada en los síntomas de la esclerosis inducida experimentalmente (encefalomielitis experimental autoinmune), así como una marcada reducción en la degeneración axonal producida por la misma estrategia experimental. Adicionalmente, en ratones silvestres se observa una mejoría de ambos parámetros aplicando amilorida (10 mg/Kg; los resultados de la mejoría fueron similares a nivel comparable al de los *knockout* pero la protección resultó menor) (Friese y cols., 2008).

Por otro lado, también se encontró a ASIC1a como un componente importante de la fisiopatología de las crisis convulsivas; ésto se estudio en un modelo de convulsiones tónico-clónicas inducidas por ácido kaínico en donde los ratones que carecían de la subunidad ASIC1a padecían convulsiones más severas que los silvestres. Lo anterior se piensa es debido a que las interneuronas inhibitorias de los cerebros de ratón cuentan con una mayor densidad de canales ASIC (en su mayoría 1a) que las excitatorias (Bolshakov y cols., 2002), y que la acidosis en el tejido cerebral producto del exceso de actividad por los episodios epilépticos activan los ASICs de dichas interneuronas que a su vez liberan el neurotransmisor inhibitorio sobre las neuronas excitatorias, poniendo freno a los episodios epilépticos (Ziemman y cols., 2008). También se propuso que los síntomas neurotóxicos secundarios a la hiperamonemia (por ej. en cirrosis, encefalopatía hepática, etc.) son debidos a la activación anormal de los ASIC por el ión NH_4^+ . (Pidoplichko y Dani, 2006).

Además de su participación en situaciones patológicas, también se ha reportado que los canales ASIC1a participan en el mantenimiento de la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo (Wemmie y cols., 2002). Los ratones *knockout* para ASIC1a fallan en el mantenimiento de la LTP. Esto ha sido corroborado por pruebas conductuales, en donde los ratones carentes de la subunidad 1a mostraron déficit de memoria y aprendizaje espacial. La explicación de este importante fenómeno se basa en que las vesículas sinápticas liberadas por las neuronas presinápticas glutamatérgicas son ácidas, con un pH alrededor de 5.7 (Miesenbock y cols., 1998), lo que podría acidificar el espacio sináptico y activar al ASIC1a, lo cual llevaría a una despolarización de la membrana postsináptica promoviendo la liberación del bloqueo que presentan los canales asociados al receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) por parte del Mg^{2+} . Por otra parte, y de manera paradójica, está bien documentada la inhibición de los canales NMDA por parte de los H^+ , hecho que también podría determinar una participación significativa del pH en la neuromodulación de la transmisión sináptica (Traynelis y Chesler, 2001; Bianchi y Drischoll, 2002). El problema con la idea de que los ASIC son activados por los protones que están contenidos en las vesículas de neurotransmisor es que no ha podido ser comprobada repetidamente de manera experimental, cuando menos en sinapsis del sistema nervioso central (Álvarez de la Rosa y cols., 2003; Wemmie y cols., 2003).

Miembros de la familia ENaC/DEG en el oído interno

Diversos grupos de investigación han estudiado la presencia de canales de la familia de los ENaC/DEG/ASIC en el oído interno. La mayor parte de estos trabajos se han orientado al estudio del transporte iónico en la cóclea (Couloigner, 2001; Grunder y cols., 2001; Zhong y Liu, 2004) o la mecanotransducción (Höger y French, 2002; Hildebrand y cols., 2004; Roza y cols., 2004). Las subunidades α , β y γ de ENaC se expresan en las regiones epiteliales y no epiteliales de la cóclea, incluyendo el ganglio espiral. Se ha propuesto que su función está relacionada con el mantenimiento de las bajas concentraciones de Na^+ endolinfático y consecuentemente contribuyen a la generación del potencial endococlear (Couloigner, 2001; Grunder y cols., 2001; Zhong y Liu, 2004), esto podría explicar la aparición de una sordera congénita en los ratones *knockout* para ASIC3 (Hildebrand y cols., 2004).

Por otra parte, debido principalmente a que las degenerinas (MEC-4 y MEC-10) se han asociado con la mecanotransducción y a que la transducción mecanoeléctrica en las células ciliadas en vertebrados es sensible a la amilorida (Jorgensen y Ohmori, 1988), varios autores han buscado en esta familia de canales, sin éxito hasta hoy, la probable identidad de los canales mecanosensibles de las células ciliadas (Hildebrand, 2004; Roza y cols., 2004). Por ejemplo, la presencia de ASIC1b ha sido detectada en la punta de los cilios con microscopía electrónica de transferencia, haciéndolo un candidato posible para la transducción mecanoeléctrica (Ugawa y cols., 2006). Contrario a esto, y como ya mencionamos, evidencias recientes sugieren que los canales de mecanotransducción en células ciliadas de los vertebrados están relacionados con la familia de los canales TRP. Estos resultados apuntan entonces a la familia de canales TRP, y no a los ENaC/DEG/ASIC, como la que más probablemente subyace a la mecanorrecepción en células ciliadas.

Mediante estudios de inmunohistoquímica y RT-PCR en la cóclea de ratón, se ha demostrado la expresión robusta de la subunidad ASIC3 en las neuronas del ganglio espiral (Hildebrand y cols., 2004). Igualmente en la cóclea, se ha observado en un modelo de ratón *knockout* de ASIC2 (que incluye las variantes de splicing ASIC2a y/o 2b) que éste es el principal responsable de las corrientes iónicas activadas por H^+ en el ganglio espiral, y que podría participar en la modulación de estímulos auditivos supraumbrales (Peng y cols., 2004). En el sistema vestibular de la rata se han clonado tres subunidades, ASIC 1a, 1b y 4 (Gründer y cols., 2000; Bässler y cols., 2001), y a través de RT-PCR se amplificó el cDNA para estas subunidades. Su papel funcional dentro de esta modalidad sensorial aún no es claro, y los autores no hacen ninguna propuesta respecto de su posible papel funcional en el vestíbulo.

Cabe hacer notar que otros canales sensibles a pH extracelular como los receptores vainilloides (VR1) han sido amplificadas a través de RT-PCR del aparato vestibular de la rata (Balaban y cols., 2003); también en el órgano de Corti, se ha descrito la expresión del receptor VR1 y se encontró que su agonista la capsaicina modifica la respuesta tonotópica de las células de la cóclea (Zheng y cols., 2003).

Modulación de la descarga aferente en el vestíbulo por pH extracelular

Nuestro grupo de trabajo se ha interesado por el efecto modulador que tienen los protones sobre la actividad eléctrica aferente del nervio vestibular (Vega y cols., 2003). El registro extracelular multiunitario del nervio del canal semicircular posterior del vestíbulo del axolotl, mostró que la actividad eléctrica de las neuronas aferentes de los canales semicirculares es sensible a cambios de pH extracelular. En este mismo trabajo se mostró que el efecto del pH podría deberse, cuando menos en parte, a la sensibilidad de los receptores a aminoácidos excitadores por los H^+ , entonces la disminución o aumento de la actividad de los receptores postsinápticos explicaría el efecto del pH sobre la descarga aferente vestibular (Vega y cols., 2003). De este modo, la evidencia que relaciona al pH, la neuromodulación y la neurotransmisión es cada día más abundante.

La modulación de la descarga de las neuronas aferentes vestibulares por cambios en el pH extracelular puede tener un papel funcional importante ya que se ha propuesto que las terminales glutamatérgicas liberan hidrogeniones debido a que para concentrar glutamato en su interior, las vesículas sinápticas se valen del gradiente electroquímico creado por una H^+ -ATPasa (sensible a bafilomicina A[1]), lo cual determina que su pH pueda llegar hasta 5.7 (Miesenböck y cols., 1998). Esto implica que la liberación del neurotransmisor en las terminales glutamatérgicas puede producir cambios significativos en el pH del medio acidificándolo, sobre todo en las sinapsis en forma de listón en donde el contenido de una gran cantidad de vesículas de neurotransmisor son liberadas, tal como se ha demostrado que ocurre en la retina (DeVries, 2001; Palmer y cols., 2003; Hosoi y cols., 2005).

Además de la influencia "sináptica" que pudieran ejercer los protones que se liberan junto con el neurotransmisor, los cambios sistémicos de pH, podrían ocurrir durante estados patológicos de acidosis o alcalosis metabólica. Se ha reportado que estos cambios tienen influencia en los síntomas de la enfermedad de Ménière (Celestino y cols., 1976) y pueden ser causa de recurrencia de vértigo en pacientes con disfunción vestibular (Morinaka, 1994). Por otro lado, se ha observado que los estímulos eléctricos similares a los utilizados en implantes cocleares producen cambios importantes en el pH cuando se utilizan a alta frecuencia (Huang y cols., 2001).

RESUMEN

Desde el desarrollo de los conceptos de medio interior y de homeostasis se ha considerado que ciertos parámetros fisiológicos varían en un rango muy restringido y algunos de ellos, como el pH, están regulados por sistemas redundantes de amortiguadores y bombas de membrana por lo que para fines prácticos su variabilidad es casi nula, a pesar de que ciertos compartimentos tanto intra (mitocondrias, vesículas sinápticas) como extracelulares (estomacal) pueden tener pHs diferentes al del plasma que es prácticamente neutro.

Sin embargo, se ha demostrado que debido a lo reducido del espacio extracelular y a las características complejas de los procesos de difusión en medios no homogéneos, es posible que haya variaciones importantes de pH en ciertos compartimentos y micro regiones del organismo. El hallazgo de receptores ionotrópicos específicos para protones (H^+), y su localización principalmente en las membranas postsinápticas de las neuronas del sistema nervioso central de diversas especies ha llevado a postular a los H^+ como mediadores en la comunicación intercelular. Previamente determinamos que la función del órgano vestibular de vertebrados es sensible a cambios de pH extracelular (Vega y cols., 2003). El objetivo del presente trabajo de tesis fue determinar si las células excitables del órgano vestibular de mamífero (células ciliadas y neuronas aferentes vestibulares) presentan corrientes iónicas activadas específicamente por cambios en el pH extracelular, y definir el papel que estas corrientes tienen en la fisiología del vestíbulo.

El efecto de cambios en el pH extracelular fue evaluado en las células aisladas del órgano vestibular de la rata con la técnica de control de voltaje y de corriente en la configuración de célula completa. Las células ciliadas (tanto tipo I como II) no mostraron cambio en la corriente registrada al voltaje de mantenimiento cuando la perfusión se cambió de la solución con pH fisiológico (pH = 7.4) a una solución con pH = 5.5 ($V_H = -90$ mV para las tipo I y $V_H = -60$ mV para las tipo II). Por otro lado, en un subgrupo de neuronas aferentes vestibulares de diámetro somático y capacitancia pequeña, el cambio a pH extracelular ácido (pH < 7) activó una corriente iónica entrante acarreada principalmente por iones sodio; esta corriente incrementó su magnitud en función de la concentración extracelular de protones y se encontró completamente activada a pH \approx 5.5. La corriente activada por protones mostró una cinética de activación rápida y una desensibilización casi completa con un curso temporal que se ajustó con una función exponencial simple. La corriente fue modulada por la concentración extracelular de calcio y fue sensible al bloqueo del diurético amilorida, gadolinio, plomo y el ácido acetil salicílico. El neuropéptido FMRF-amida y el zinc en altas concentraciones incrementaron la corriente activada por protones. Por las características electrofisiológicas y farmacológicas antes mencionadas se dedujo que esta corriente fue acarreada a través de canales ASIC (por sus siglas en inglés *Acid Sensing Ionic Channels*). Las neuronas que presentaron los ASIC dispararon potenciales de acción cuando el pH extracelular se modificó a 6.1, los cuales fueron inhibidos con amilorida. Para determinar qué subunidades conformaban los ASIC expresados en las neuronas aferentes vestibulares se realizó inmunohistoquímica de fluorescencia utilizando anticuerpos específicos para las distintas subunidades. Se encontró la expresión de las subunidades ASIC 1a, 2a, 2b, 3 y 4 en los cuerpos neuronales del ganglio vestibular, mientras que para la subunidad ASIC 1b no se observó inmunofluorescencia. Adicionalmente la expresión de la subunidad 1a y 2a fue localizada en las terminales nerviosas que inervan el epitelio sensorial del sistema vestibular. Las neuronas inmunoreactivas fueron medidas y su capacitancia fue estimada, encontrándose que este parámetro fue similar a la capacitancia medida electrofisiológicamente en las neuronas que presentaron funcionalmente ASICs.

El patrón de expresión restringido a una subpoblación del ganglio vestibular sugiere que los ASIC participan en la generación de los patrones de descarga de potenciales de acción de las neuronas que los presentan, ya sea incrementando su entrada sináptica por acumulación de protones provenientes de vesículas sinápticas o modulando la respuesta de los receptores a aminoácidos excitadores que se reconocen como los neurotransmisores en la sinapsis entre las células ciliadas y las neuronas aferentes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Teniendo en cuenta que la transmisión aferente vestibular es glutamatérgica, es razonable pensar que los protones que se coliberan con el glutamato en esta sinapsis en forma de listón modulen corrientes iónicas de las células ciliadas y neuronas aferentes vestibulares, además de que las evidencias preliminares, sugieren que estas neuronas expresan conductancias iónicas activadas por H^+ tipo ASICs que tendrían una influencia significativa en la transmisión de la información vestibular. Más aún, considerando las características peculiares de la sinapsis en las células ciliadas tipo I que poseen un cáliz complejo que restringe la difusión de los materiales liberados por la célula ciliada (Soto y cols., 2002), parece relevante estudiar la existencia de conductancias iónicas activadas por H^+ extracelulares en las células ciliadas y en las neuronas aferentes aisladas del aparato vestibular de la rata.

HIPÓTESIS

Las neuronas aferentes vestibulares y probablemente también las células ciliadas expresan canales iónicos sensibles a protones (ASIC) cuya actividad influye en la descarga de las neuronas aferentes.

OBJETIVOS

General

Determinar la expresión de las diferentes subunidades de canales iónicos tipo ASIC y estudiar las corrientes iónicas activadas por H^+ en las células ciliadas y en las neuronas aferentes vestibulares de la rata.

Específicos

- Determinar si las células ciliadas tipo I y tipo II aisladas del aparato vestibular de la rata expresan conductancias iónicas activadas por H^+ .
- Determinar si las neuronas aferentes vestibulares en cultivo primario de la rata expresan conductancias iónicas activadas por H^+ .
- Determinar las propiedades farmacológicas de las corrientes iónicas sensibles a H^+ que hayamos identificado.
- Realizar estudios inmunocitoquímicos de la expresión de las distintas subunidades de los ASICs en el sistema vestibular de la rata.
- Determinar el efecto de cambios en el pH extracelular sobre el potencial de membrana de las neuronas aferentes vestibulares.

Este proyecto pretende aportar pruebas sobre la participación de los protones como moduladores de la neurotransmisión en el sistema vestibular, campo en el cual todavía se especula sobre su función, y se utilizará un modelo experimental en donde no se ha evaluado su efecto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo del proyecto utilizamos técnicas electrofisiológicas (fijación de voltaje y corriente) e inmunohistoquímicas.

Se usaron ratas de la cepa Wistar de entre 14 a 17 días de edad postnatal para aislar células ciliadas, y de 7 a 10 días para realizar cultivos de neuronas aferentes vestibulares. En estas preparaciones se estudiaron las corrientes iónicas producidas por cambios de pH. Los animales se anestesiaron y sacrificaron por decapitación. El número de animales en cada experimento se mantuvo al mínimo necesario para lograr significación estadística. Para aislar el oído interno, el maxilar inferior se separó del superior, el cráneo se fijó en una cámara con base de sylgard y se perfundió inmediatamente con solución extracelular normal de rata (tabla II). Bajo microscopio estereoscópico se quitaron los huesos de la bóveda craneal, se identificó el oído interno y se procedió a disecarlo.

En el caso de las disecciones en que se extrajeron tejidos para cultivos celulares, la disección se realizó en una campana de flujo laminar y en condiciones de estricta asepsia (Soto y cols., 2002).

Disociación celular: células ciliadas

Una vez que se disecaron los epitelios sensoriales de la rata, se realizó una disociación enzimática para aislar a las células ciliadas. Trabajos previos en nuestro laboratorio nos han llevado a establecer un método de disociación con el cual obtenemos células ciliadas aisladas en buenas condiciones (Almanza y cols., 2003; Vega y Soto, 2003).

El procedimiento es el siguiente:

1. Los epitelios se colocaron en solución extracelular normal, a la cual se le agregó colagenasa tipo IA (Sigma) 0.1 mg/ml durante 7 minutos a una temperatura de 35°C.
2. La preparación se cambió a una solución extracelular sin Ca^{2+} y Mg^{2+} conteniendo tripsina (Sigma) 1 mg/ml durante 10 minutos a 35°C.
3. Posteriormente, la preparación se colocó en solución extracelular sin Ca^{2+} y Mg^{2+} adicionada con albúmina sérica bovina (Sigma) 1 mg/ml durante 10 minutos a 4°C.

Por último, el tejido se trasladó a la cámara de registro ubicada en la platina de un microscopio invertido (Nikon Diaphot) en donde las células ciliadas se separaron mecánicamente con dos disectores de vidrio con puntas finas redondeadas a fuego y se dejaron reposar durante 10 minutos en solución extracelular normal (Tabla II) sin flujo para que las células se adhirieran al fondo de la cámara. Posteriormente se inició la perfusión con esta misma solución (1 ml/min).

Tabla II Soluciones (en mM)

	KCl	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂	HEPES	MES	EGTA	GTPNa	ATPMg	Glucosa
Extracelular normal [†]	5.4	140	2	1.8	10	----	----	----	----	10
Intracelular normal ^{††}	125	10	----	0.1	10	----	10	1	2	----
Extracelular sin Ca ²⁺ y Mg ²⁺ [†]	5.4	140	----	----	10	----	1	----	----	10
Extracelular con pH < 6.5	5.4	140	2	1.8	----	10	----	----	----	10

[†]Las soluciones extracelulares fueron tituladas a pH con NaOH (300 mOsm).

^{††}La solución intracelular fue titulada a pH 7.2 con KOH (≈ 280 mOsm).

Disociación y cultivo de neuronas aferentes

El cultivo celular se llevó a cabo en un cuarto especialmente destinado para ello; éste cuenta con una campana de flujo laminar seguridad I (Nuair), una incubadora con atmósfera de CO₂ (Nuair), un microscopio invertido de contraste de fase (Nikon) y uno estereoscópico para la disección (American Optical). Todo el material rigurosamente limpio (tanto el de disección como el de cultivo) fue previamente esterilizado con su exposición a luz UV.

Las neuronas aferentes vestibulares se obtuvieron de ratas neonatas de la cepa Wistar con una edad de entre 7 y 10 días; éstas se anestesiaron con halotano y se sacrificaron por decapitación. La cabeza se lavó con etanol al 70%, se le retiró el maxilar inferior y el cráneo se colocó en una caja de Petri con medio de cultivo L-15 al 100% (Gibco) en la cual se llevó a cabo la disección de los ganglios vestibulares (GV). Los GV fueron inmersos en medio L-15 al 100% adicionado con colagenasa y tripsina 1.25 mg/ml cada una (Sigma) durante 30 minutos a 37°C, posteriormente fueron lavados 3 veces con medio L-15 al 100% sustituyendo el volumen del medio que contenía la enzima por medio fresco; entre cada lavado la suspensión se centrifugó por cinco minutos e inmediatamente después las células se resuspendieron y disociaron mecánicamente con ayuda de una pipeta Pasteur con la punta pulida a fuego. La última resuspensión se colocó en cajas de Petri de 35 mm de diámetro con un sustrato de poli-D-lisina y 2 ml de medio L-15 modificado que contenía: suero bovino fetal al 10% (Gibco), 500 UI de penicilina (Lakeside), fungizone 2.5 µl/ml (Gibco), NaHCO₃ 15.7 mM (Merck), HEPES 15.8 mM (Sigma) y pH 7.7 ajustado con NaOH. Las células permanecieron en cultivo dentro de la incubadora con una atmósfera de 5% de CO₂ por un periodo no mayor a 24 horas ni menor a 18.

Registro electrofisiológico (fijación de voltaje)

Los registros de corrientes iónicas se llevaron a cabo mediante la técnica de fijación de voltaje en su versión de célula completa y se realizaron a temperatura ambiente (20-22°C) usando un amplificador de fijación de voltaje (Axopatch 1D ó 200B, Axon Instruments). La señal de salida

del amplificador fue filtrada con un corte de frecuencias de 2 a 5 KHz y el muestreo fue a 5 KHz. Los registros se digitalizaron con un convertidor analógico-digital (Digidata 1200 o una Digidata 1320A) utilizando un sistema pClamp (versión 8 o 9, Axon Instruments) y se almacenaron en el disco duro de una computadora PC compatible. Las pipetas para los registros de fijación de voltaje se hicieron con un estirador horizontal (Sutter P-96) y se emplearon pipetas de vidrio de borosilicato (WP Instruments) las que una vez llenadas con solución intracelular normal (Tabla II) tuvieron una resistencia de entre 1-5 M Ω . El potencial de punta para las soluciones de registro fue menor a 5 mV por lo que no fue corregido.

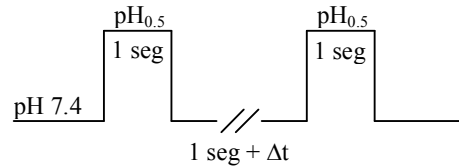
La versión de célula completa de la técnica de fijación de voltaje se obtuvo después de cancelar la capacitancia de la pipeta y de formar un sello >2 G Ω . En estas condiciones, la resistencia de acceso (R_a), resistencia de membrana (R_m), constante de tiempo (τ_m) y capacitancia de membrana (C_m), se calcularon en línea con el programa pClamp. Para medir el potencial de membrana (V_m) de las células fue utilizado el método de fijación de corriente sin inyección de corriente. Una vez que se registraron las propiedades pasivas, la capacitancia y el 80% de la resistencia en serie se compensaron electrónicamente en todos los registros.

Para el estudio de las propiedades biofísicas de los canales activados por H^+ se estimularon a las células con cambios rápidos de solución extracelular titulada a distintos pHs (lapsos de 5 segundos de duración) con un sistema de perfusión SB-77 (Warner Inst.) o uno piezoeléctrico Burleigh LSS-3200 controlado por el programa Clampex 9.2 (Axon Inst.). Éste último permite un recambio ultrarápido de la solución extracelular que permitió determinar la cinética de activación de la corriente activada por H^+ (ver RESULTADOS; la constante de tiempo del cambio de solución fue de 12 ms, se determinó por el cambio en el potencial de punta). Las células fueron mantenidas a un potencial de membrana de -60 mV durante todos los protocolos a menos que se indique lo contrario. Al principio de cada registro se aplicó un pulso de voltaje de -60 a -70 mV con una duración de 50 ms para monitorear la R_a .

Protocolos de fijación de voltaje

De los registros obtenidos se calculó la τ_{desen} ajustando una función exponencial a la fase de caída de la corriente iónica ($y = y_0 + Ae^{-x/t}$). También se determinó la corriente resistente a la desensibilización midiendo la corriente persistente al final de la estimulación y normalizándola con respecto al pico.

Para estudiar la recuperación de la desensibilización (τ_{recup}) se utilizó un protocolo en donde la célula fue mantenida en un $V_H = -60$ mV, se perfundió a pH_{0.5} durante 1 seg y luego de un intervalo de tiempo que fue aumentando se aplicó por segunda vez la solución con pH_{0.5}, inicialmente el intervalo entre pulsos fue de 1 seg, y éste se incrementó ($\Delta t = 500$ ms) hasta que ambas corrientes tuvieron la misma amplitud, como se ilustra en el esquema siguiente:



El intervalo entre cada protocolo fue de 50 segundos y los resultados se graficaron como la amplitud de la corriente en función del tiempo, normalizando la respuesta a la segunda aplicación de pH respecto a la corriente control. Los datos se ajustaron con una función exponencial.

Protocolos farmacológicos

La curva concentración-respuesta para el pH se realizó comparando la corriente evocada con una solución a pH 5 (que para las neuronas aferentes vestibulares fue saturante; ver RESULTADOS) con respecto a la respuesta con el pH de prueba (pH 7, 6.5, 6.1, 6, 5.5), en ambos casos la aplicación del pH ácido se realizó por duplicado. Para todos los experimentos el intervalo entre cada estimulación con cualquier pH fue de 50 segundos, lo anterior para asegurarnos que la corriente iónica se hubiera recuperado completamente de la desensibilización según lo reportado previamente y lo encontrado en el presente trabajo (ver RESULTADOS).

Para el estudio de la farmacología de los ASICs en las neuronas aferentes que respondieron a los cambios de pH, se comparó la respuesta por duplicado en control a $\text{pH}_{0.5}$ con una de prueba por duplicado coaplicando el fármaco. Al final del protocolo de farmacología se aplicó $\text{pH}_{0.5}$ (como en el control) para observar la reversibilidad del efecto del fármaco. Los fármacos estudiados fueron: amilorida (fármaco para el cual se realizó una curva concentración-respuesta utilizando las siguientes concentraciones: 0.1, 1, 3, 10, 30 y 100 μM), FMRFamida 100 μM , gadolinio 100 μM , acetato de plomo 10 μM , zinc 300 μM , N,N,N',N'-Tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamina (TPEN) 10 μM y ácido acetilsalicílico (ASA) 100 μM y 1 mM.

Los datos de las curvas dosis-respuesta (tanto de pH como de amilorida) fueron ajustados con una ecuación dosis-respuesta: $y = A1 + [(A2 - A1)/1 + 10^{(\log x / \log x_0 - x)^p}]$. En donde A1 es la asíntota inferior y A2 la asíntota superior de la curva, $\log x_0$ es el punto medio entre A1 y A2 (dosis inhibitoria o excitatoria 50) y p es el número de Hill.

Se estudió la influencia de la concentración de Ca^{2+} extracelular (1.8 y 3.6) sobre la activación de la corriente sensible a H^+ . Esto debido a que, como ya mencionamos, se ha propuesto que los ASICs están constitutivamente abiertos y bloqueados por iones Ca^{2+} , los cuales entonces desplazan la curva de sensibilidad a los protones a la derecha.

Adicionalmente, se usó un agonista y un antagonista para el canal TRPV1: capsaicina y capzacepina, ya que se ha propuesto la expresión de los TRPV1 en el vestíbulo de la rata (Balaban y cols., 2003).

Todos los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media. Se consideró significativa una diferencia cuando su P fue menor a 0.05 utilizando la prueba t de Student. Los datos fueron analizados con los programas Clampfit 9, Origin 7 y Sigmaplot 10.

Histología e inmunohistoquímica del oído interno

Cabe destacar que esta parte del proyecto se realizó en colaboración con el Dr. Iván López de la Universidad de California campus Los Ángeles, con quien tuvimos un convenio específico para el estudio de los ASICs en el oído interno (apoyado vía la convocatoria UC-MEXUS-CONACyT). Las ratas Wistar de edad 12 días de edad posnatal se anestesiaron y se perfundieron con paraformaldehído al 4% (López y cols., 2005). El hueso temporal se removió del cráneo y se mantuvo inmerso en fijador por 24-48 hrs. Posteriormente se descalcificó por inmersión en una solución de EDTA al 3% en buffer de fosfatos (PBS) por 7 días. Se completó la microdissección de la bula auditiva y el laberinto membranoso se mantuvo en inmersión en sucrosa al 30% por 3 días. Se realizaron secciones seriales de 14 μm usando un crióstato. Para ello, el oído se orientó para seccionar la parte modiolar media de la cóclea, las crestas de los canales semicirculares, la mácula del utrículo y los GV y espiral. Las secciones se montaron en laminillas de vidrio especiales para adherirse al tejido (*Superforst plus slides*) y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para la tinción inmunohistoquímica, los tejidos se incubaron a temperatura ambiente por 30 min con una solución bloqueadora conteniendo 5% de suero normal de cabra o caballo, 0.5% de albúmina sérica bovina, Tritón X-100 al 0.5%, todo en PBS. Posteriormente se removió esta solución y se aplicó el 1er anticuerpo (policlonal o monoclonal según el caso). Los anticuerpos utilizados en este trabajo fueron contra las proteínas siguientes: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2, ASIC2b, ASIC3 y ASIC4 (diluidos 1:500, de las marcas Alpha Diagnostic International, Chemicon y Alomone). Los anticuerpos de la marca Alpha Diagnostic (se probaron los anticuerpos contra todas las subunidades) están dirigidos a reconocer epítopes contra la porción amino terminal, excepto el de ASIC3 que está dirigido contra el carboxilo terminal. Todos los epítopes que reconocen estos anticuerpos son intracelulares. De la marca Alomone se probaron los anticuerpos contra ASIC2a, ASIC3 y ASIC4, todos reconociendo partes del extremo amino terminal intracelular. Mientras que de Chemicon se probaron los anticuerpos contra ASIC1b y ASIC3, también contra la porción N-terminal. Las preparaciones se incubaron en una cámara húmeda a 4°C por 48 hrs. Luego de la incubación con el primer anticuerpo, los tejidos se lavaron tres veces por 10 minutos en PBS. Se aplicó entonces el anticuerpo secundario consistente en anticuerpos Anti IgG contra ratón o conejo marcados con Alexa 488 (1:1000) incubándose las preparaciones en la oscuridad por una hora a temperatura ambiente.

En todos los casos se realizaron controles incubando las preparaciones con el anticuerpo primario preabsorbido con el péptido bloqueador respectivo (Alpha Diagnostic), u omitiendo el primero o el segundo anticuerpo.

Luego de la incubación las preparaciones se lavaron tres veces con PBS y fueron montadas en Vectashield. Las laminillas se observaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E800) y se digitalizaron usando una cámara digital (RTSlider, Spectra) y el software Image Pro Plus (MediaCybernetics). La inmunorreactividad a los ASIC se examinó en preparaciones completas de la cóclea y el vestíbulo. Adicionalmente se realizaron controles positivos en cortes de neuronas del ganglio de la raíz dorsal y en cerebelo que fueron obtenidos y tratados de igual manera que los del vestíbulo y ganglio espiral; en las imágenes presentadas en la sección de *resultados* se combinó el campo claro al campo de la fluorescencia para poder observar con mayor claridad las estructuras de la rebanada.

Las neuronas inmunorreactivas fueron medidas para hacer una estimación de su capacitancia. Para determinar la superficie de las células se asumieron como esféricas, el diámetro mayor y menor se promedió y se aproximó un radio. El área de la membrana de la célula fue calculada con la ecuación $4\pi r^2$, que se utiliza para determinar la superficie de una esfera. Al final, el área se transformó en capacitancia utilizando un valor de capacitancia específica de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

RESULTADOS

Corriente activada por protones en las células ciliadas

En las células aisladas se buscó la presencia de canales iónicos sensibles a la concentración extracelular de protones tanto en células ciliadas como en las neuronas aferentes vestibulares usando la técnica de fijación de voltaje (*patch clamp*) en la configuración de célula completa.

En las células ciliadas tipo I ($n = 7$) y tipo II ($n = 7$) aisladas de los canales semicirculares del vestíbulo de la rata no se activó ninguna corriente iónica cuando fueron expuestas a un cambio en el pH extracelular de 7.4 a 5.5 (Fig. 7).

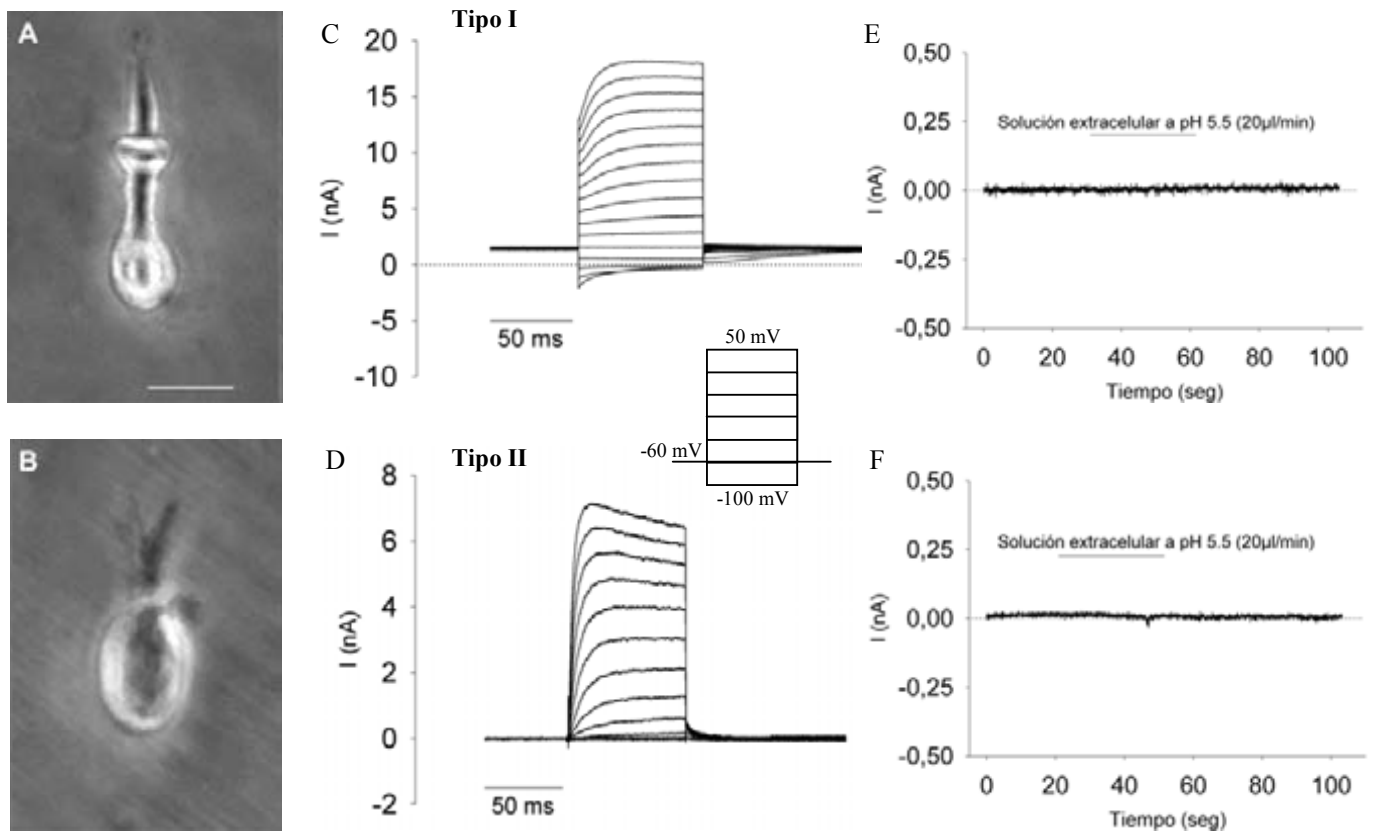


Figura 7. Efecto de cambios del pH extracelular en las células ciliadas aisladas de los canales semicirculares de la rata. En A y B se muestran micrografías de células ciliadas tipo I (A) y II (B). Éstas mantienen su forma característica de ánfora para las tipo I y predominantemente cilíndricas para las tipo II. La barra de calibración en A equivale a 10 µm. En C y D se muestran registros típicos de la corriente iónica total de células ciliadas tipo I y II respectivamente. Las corrientes iónicas fueron generadas por el protocolo de fijación de voltaje mostrado en el inserto. Las células tipo I presentan una conductancia iónica de bajo umbral de activación conocida como g_{KL} , (por su bajo umbral al $V_H = -60$ mV se observa su deactivación), y las corrientes iónicas de las tipo II presentan corrientes tipo rectificador retardado y transitoria de potasio. En E y F registro de fijación de voltaje donde se muestra el efecto que tuvo el cambio del pH extracelular sobre la célula ciliada tipo I (E, $V_H = -90$ mV), y tipo II (F, $V_H = -60$ mV). El cambio de pH de 7.4 a 5.5 no produjo ninguna corriente iónica en ambos tipos celulares.

En las neuronas aferentes vestibulares de la rata (Fig. 8), se encontró que un cambio hacia pHs ácidos en el medio extracelular promueve la apertura de canales iónicos por los cuales pasa una

corriente iónica de rápida activación y que se desensibiliza casi completamente durante la aplicación del pulso de pH (de una duración de 5 segundos) (Fig. 9A).

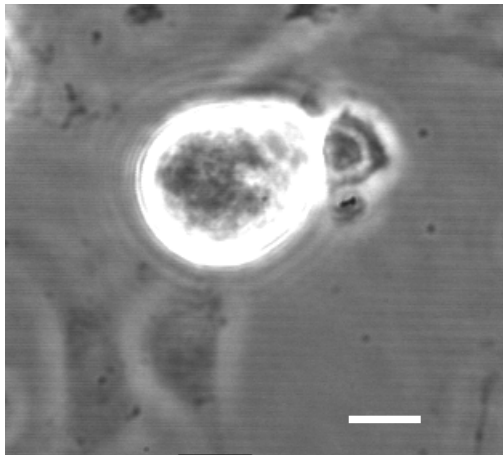


Figura 8. Micrografía de una neurona aferente vestibular aislada y mantenida en cultivo primario. Al contraste de fases las neuronas que se registraron se mostraron refringentes con somas redondeados u ovoideos. La barra de calibración equivale a 10 μm .

La corriente iónica es conducida principalmente por iones sodio, debido a que su potencial de inversión es alrededor de 59 mV ($n = 3$; V_{eq} del $\text{Na}^+ = 66$ mV), y porque cuando se sustituyó equimolarmente el cloruro de sodio por cloruro de colina, sólo persistió el 1.8 ± 0.8 % de la corriente activada por pH 6.1 ($n = 9$) (Fig. 9A). La corriente presentó una sensibilidad a los protones dependiente de la concentración extracelular de los mismos; normalizando la corriente a la respuesta obtenida a pH 5, el ajuste de Hill mostró que a pH 6.2 se activa el 50% de la corriente ($\text{pH}_{0.5}$) con una pendiente de 1.8 (Fig. 9B). Evaluamos el efecto de cambios en la concentración extracelular del ión calcio de 1.8 mM a 3.6 mM, y encontramos que la sensibilidad de la corriente a los H^+ se redujo, ya que la curva de sensibilidad a los protones se desplazó a la derecha; bajo estas condiciones el ajuste dosis respuesta dio un $\text{pH}_{0.5}$ de 6.05 con una pendiente de 1.8 (Fig. 9B). Posteriormente usando como estímulo la perfusión de solución extracelular a pH 6.1 (valor cercano al $\text{pH}_{0.5}$ con una solución extracelular con calcio 1.8 mM), se estudiaron los parámetros biofísicos de la corriente. Se encontró que la corriente iónica producida por protones tuvo una densidad de corriente (medida al pico) de -56 ± 4 pA/pF ($n = 86$). El porcentaje de corriente resistente a la desensibilización fue de 6 ± 0.7 % ($n = 86$; medida a los 4 segundos después del pico). La desensibilización de la corriente tuvo una constante de tiempo de 129 ± 4 ms ($n = 86$; Fig. 9A). La corriente ASIC se activó con una constante de tiempo de 33 ± 5 ms ($n = 17$; la constante de tiempo fue estimada con una función exponencial simple), cabe aclarar que el parámetro sólo se midió en las células que fueron estimuladas con el perfusor piezoeléctrico que permite un cambio ultra rápido de la solución extracelular. Mediante el uso del protocolo de doble pulso se encontró que la recuperación de la desensibilización se ajustó con la suma de dos funciones exponenciales simples que arrojaron una constante de

tiempo rápida de 0.9 segundos y una lenta de 4 segundos ($n = 7$; Fig. 9C). Cabe destacar finalmente que la corriente activada por protones sólo fue encontrada (cuando se utilizó el registro electrofisiológico) en las neuronas de menor capacitancia. Dichas neuronas tuvieron una capacitancia de 18.8 ± 0.7 pF ($n = 146$), mientras que las neuronas que no expresaron dicha corriente tuvieron una capacitancia de 37 ± 1.5 pF ($n = 49$; $P < 0.001$, prueba t de Student), lo que sugiere que la corriente se presenta principalmente en las neuronas de diámetro somático pequeño (Fig. 9D).

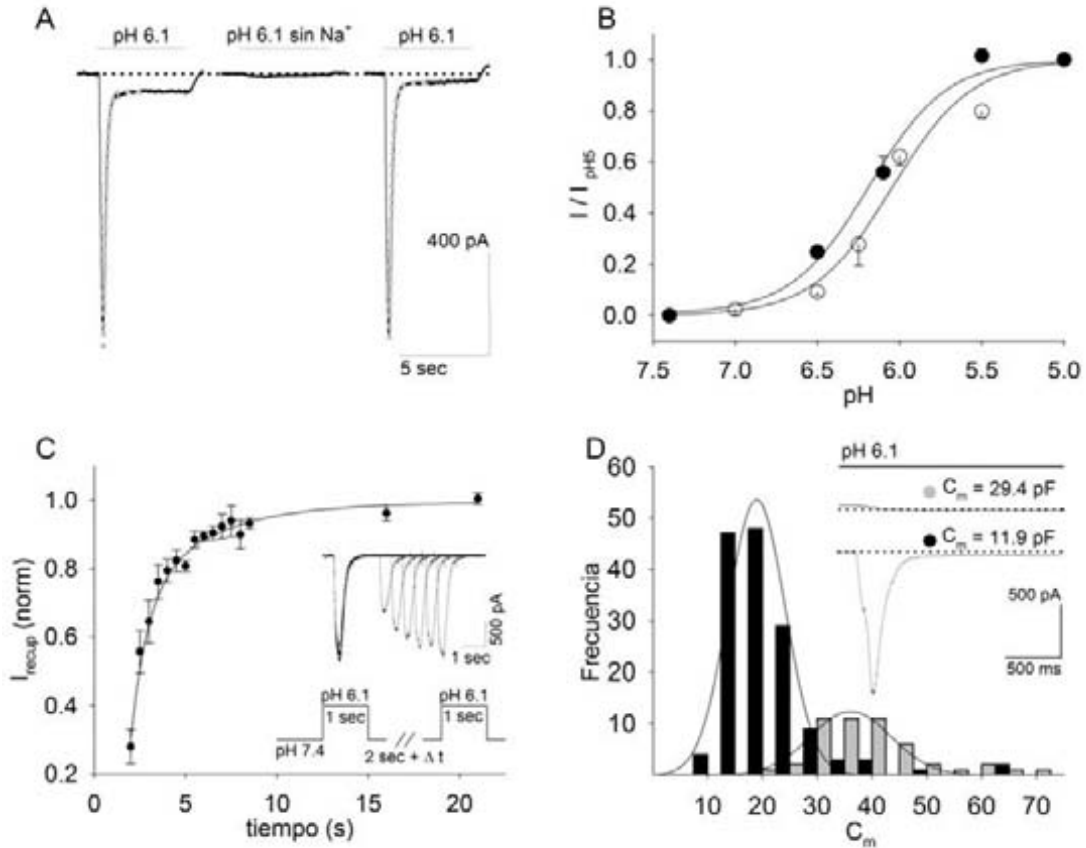


Figura 9. Propiedades de la corriente activada por protones en las aferentes vestibulares. En *A*, registro típico obtenido de una neurona aferente vestibular mantenida a un potencial de sostenimiento de -60 mV y estimulada con un pH de 6.1 (barra), cuando el Na^+ se sustituye por colina y luego del lavado. Se observa que en el control y luego del lavado se produce una corriente iónica que se activa y desensibiliza rápidamente (en este caso con una $\tau_{\text{desen}} = 154$ ms, el ajuste se muestra con una línea punteada en gris), y que es conducida principalmente por el ión sodio. En *B*, curva de sensibilidad a los protones de la corriente activada por pH ácido. Con una concentración de calcio extracelular fisiológica (círculos llenos, $[\text{Ca}^{2+}] = 1.8$ mM) dicha curva presenta un $\text{pH}_{0.5}$ de 6.2, mientras que cuando se duplica el calcio extracelular (círculos vacíos) la curva presentó un $\text{pH}_{0.5}$ de 6.06, en ambos casos el número de Hill fue de 1.8 ($r^2 > 0.98$). En *C*, gráfica de la recuperación de la desensibilización de la corriente. Los datos se ajustaron con la suma de dos funciones exponenciales con valores de constante de tiempo de 0.9 y 4 seg respectivamente. En los insertos se muestra un registro representativo y el protocolo de estimulación que se utilizó para medir este parámetro. En *D*, distribución de capacitancias de las neuronas que expresaron (en barras gris claro) y que no expresaron (en negro) corrientes iónicas activadas por protones ($n = 146$ y 49 respectivamente). Las líneas continuas son el ajuste con una función normal (ajuste con $p < 0.05$, prueba de Kolmogorov-Smirnoff). Sólo las neuronas de menor capacitancia expresaron dicha corriente. En el inserto se muestra un ejemplo de cada grupo neuronal (con su respectiva capacitancia) cuando fue estimulado con pH 6.1.

Quando se estimuló a las células mediante la perfusión de solución extracelular con pH 4 (insistimos en que las células se perfunden con solución a pH 7.4 entre los estímulos con las soluciones a diferentes pHs), se produjo una corriente entrante que a diferencia de la

anteriormente descrita tuvo una cinética bifásica, con un pico inicial de activación rápida y desensibilización parcial, seguida de una corriente de activación lenta que no decae durante la aplicación del pH ácido, obteniendo un rango muy variable de la magnitud de esa corriente (Fig. 10).

Este tipo de respuesta es típica de las corrientes ASIC que producen las subunidades ASIC3 y ASIC3 + ASIC2b (Waldmann y cols., 1997b; Lingueglia y cols., 1997), aunque puede ser debida a la suma de la activación de canales ASIC y TRPV1 (Tominaga y cols., 1998).

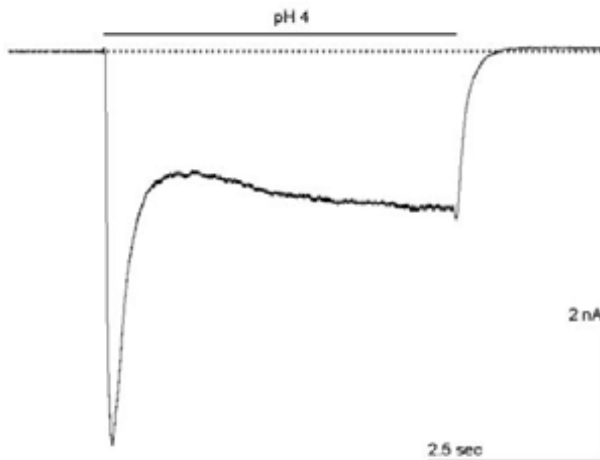


Figura 10. Registro de una corriente activada por pH 4. La corriente producida con pH 4 (barra) es de tipo bifásico, observándose el pico con cinética rápida al inicio del pulso de pH seguido de una corriente de activación lenta. La línea punteada representa el cero de corriente.

Farmacología de la corriente activada por protones en las neuronas aferentes

En primera instancia decidimos analizar la posibilidad de que la corriente iónica fuera debida a la activación de receptores del tipo TRPV1 (vainilloide), que se sabe es activado por protones, capsaicina y temperaturas mayores a 42°C (Caterina y cols., 1997; Tominaga y cols., 1998). Para esto utilizamos capsaicina como agonista TRPV1 en concentración 1 μ M y 10 μ M. Cuando el fármaco fue aplicado a las neuronas mantenidas en condiciones de fijación de voltaje no se detectó ningún cambio en la corriente iónica, por lo que se concluyó que en las neuronas aferentes vestibulares no se expresa TRPV1 ($V_H = -60$ mV; $n = 11$ y 5 respectivamente; Fig. 11).

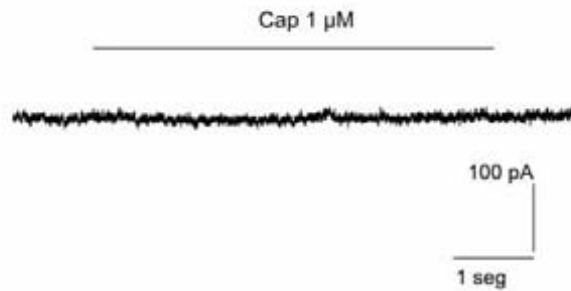


Figura 11. Efecto del agonista TRPV1 capsaicina (Cap) sobre las neuronas aferentes vestibulares. En la gráfica se muestra un registro de corriente iónica a un potencial de sostenimiento de -60 mV antes, durante y después de la aplicación de Cap 1 μM durante 5 segundos (barra).

Enseguida se procedió a estudiar el diurético amilorida en concentración 100 μM coaplicándolo con el pH ácido (solución salina titulada a pH 6.1). En estas condiciones el fármaco bloqueó el $80 \pm 2.5\%$ de la corriente al pico con respecto al control, sin afectar el componente resistente a la desensibilización, este efecto fue completamente reversible con el lavado ($n = 8$; Fig. 12A). Se realizó una curva dosis-respuesta para la amilorida, se estimó una $\text{IC}_{50} = 4.5 \mu\text{M}$ con un número de Hill de 2 ($n = 3-8$ para cada punto) (Fig. 12B). También se evaluó el efecto del lantánido gadolinio (Gd^{3+}) que a concentración 100 μM bloqueó un $76 \pm 2\%$ ($n = 6$) de la corriente al pico producida por pH 6.1. También produjo un aumento altamente variable, no significativo, de la corriente sostenida en un $40 \pm 25\%$ ($P > 0.05$ prueba t de Student pareada). Se obtuvo un lavado parcial del bloqueo en casi todas las células en que se probó el Gd^{3+} (Fig. 12C). Posteriormente se estudió el efecto del ácido acetilsalicílico (AAS) en concentración 100 μM y 1 mM sobre la corriente generada por pH 6.1. Se encontró que con 100 μM la corriente al pico fue bloqueada en un $24 \pm 4\%$ y el componente sostenido se inhibió en un $24 \pm 6\%$, en ambos casos la diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$, prueba t de Student pareada) y el efecto fue completamente reversible con el lavado (Fig. 12D). Mientras que para 1 mM el pico fue bloqueado en un $41 \pm 10\%$ ($P < 0.05$, prueba t de Student pareada) y la corriente sostenida disminuyó un $27 \pm 15\%$, éste último cambio no fue estadísticamente significativo (no mostrado).

El plomo es un neurotóxico de interés médico y en la actualidad la intoxicación con este metal sigue siendo un problema de salud pública; la intoxicación por el ión produce entre otros síntomas mareos y vértigo, lo cual sugiere una posible participación vestibular (Garza y cols., 2007). En fechas recientes se ha reportado que posiblemente el Pb^{2+} ejerza parte de su efecto neurotóxico bloqueando canales ASIC1 a nivel central (Wang y cols., 2006). Debido a lo anterior decidimos evaluar el efecto del Pb^{2+} 10 μM sobre la corriente evocada a pH 6.1. El Pb^{2+} bloqueó significativamente la corriente al pico en un $12 \pm 4\%$ y aumentó la corriente sostenida

en un 29 ± 18 % de manera no significativa ($n = 5$; $P < 0.05$, prueba t de Student pareada), este efecto fue reversible con el lavado (Fig. 12E).

También se evaluó el efecto de dos coagonistas de los canales ASICs, el neuropéptido de caracol FMRF-amida y el zinc. La FMRF-amida modula las corrientes iónicas de los ASICs preincubando a la neurona con el neuropéptido antes de ser estimulada con el pH ácido, de este modo dicho neuropéptido incrementa la magnitud de la corriente ASIC e inhibe su desensibilización; estos neuropéptidos no abren a los canales ASICs por sí solos (Askwith y cols., 2000; Deval y cols., 2003). En nuestros experimentos, posterior al registro de la corriente control (pH 6.1), se pretrató a la neurona en estudio durante 35 s con solución salina a pH 7.4 adicionada con FMRF-amida $100 \mu\text{M}$ y posteriormente fue estimulada con un pulso de solución salina titulada a pH 6.1, cabe mencionar que durante el tiempo de perfusión de la FMRF-amida no se observó ningún cambio de la corriente que se registró a -60 mV. Se encontró que la corriente al pico producida después del tratamiento con FMRF-amida se incrementó en 60 ± 3 % respecto del control, y que la corriente sostenida medida a los cuatro segundos después del pico pasó de 8 ± 2 % (con respecto al pico de la corriente) en condiciones control a 57 ± 18 % luego del tratamiento con el neuropéptido ($n = 12$) (Fig. 12F). El incremento en la corriente sostenida con el neuropéptido fue de 1400 ± 420 %. Este efecto, al igual que el de la mayoría de los fármacos que probamos en este trabajo, fue reversible con el lavado, en este caso luego de 50 segundos.

El zinc por ser un agonista específico de ASIC2a en altas concentraciones (Baron y cols., 2001; Chu y cols., 2004) fue estudiado con la intención de conocer la participación de dicha subunidad en la composición de los canales iónicos presentados por las neuronas aferentes vestibulares. El Zn^{2+} $300 \mu\text{M}$ incrementó la corriente al pico producida por pH 6.1 en un 20 ± 6 % y la corriente sostenida en un 15 ± 3 % ($n = 9$), ambos incrementos fueron estadísticamente significativos ($P < 0.05$, prueba t de Student pareada), sugiriendo una modesta participación de la subunidad 2a en la formación del canal ASIC en las neuronas aferentes vestibulares (Fig. 12G).

Como también está bien documentado el bloqueo de alta afinidad del Zn^{2+} principalmente sobre la subunidad ASIC1a, y debido a que las soluciones salinas elaboradas con sales de cloro están comúnmente contaminadas con zinc (aproximadamente en una concentración 50 nM), decidimos utilizar un compuesto quelante de zinc para evaluar si la subunidad ASIC1a participa en la formación del canal sobre las neuronas aferentes vestibulares. El TPEN $10 \mu\text{M}$ incrementó la corriente al pico en un 14 ± 4 %, dicho incremento fue estadísticamente significativo ($P < 0.05$, prueba t de Student pareada). Mientras que la corriente resistente a la desensibilización aumentó de manera no significativa en un 6 ± 4 % ($n = 5$; Fig. 12H). En la figura 13 se resumen

los efectos de los fármacos probados sobre la corriente activada por protones de las neuronas aferentes vestibulares.

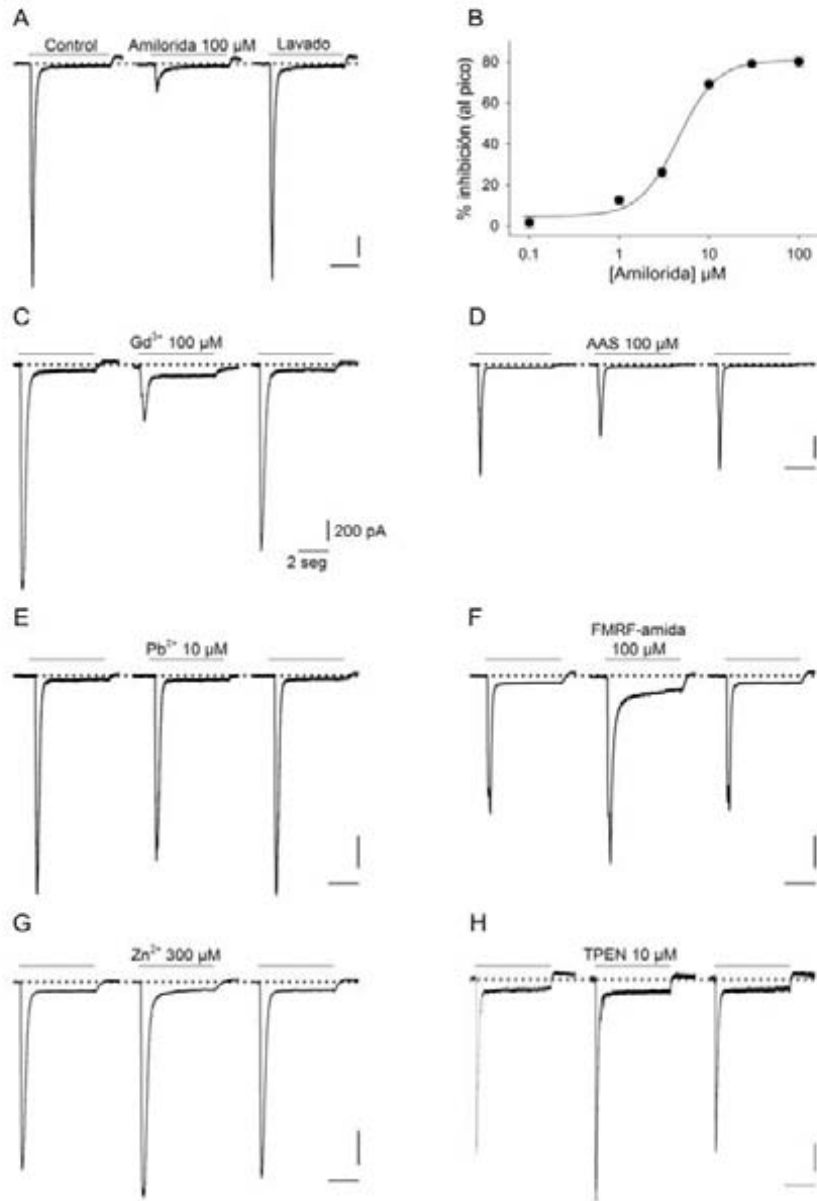


Figura 12. Efecto de los distintos bloqueadores y coactivadores de los ASIC sobre la corriente activada por protones (generada a pH 6.1) en las neuronas aferentes vestibulares. En *A* respuesta de una neurona a la perfusión de pH 6.1 durante 5 segundos (control, *trazo izquierdo*), cuando se coaplica pH 6.1 y amilorida 100 μM (*trazo de en medio*) y el lavado (*trazo derecho*). En *B* curva dosis-respuesta del diurético amilorida sobre la corriente activada por protones. La línea continua representa un ajuste de Hill donde la IC_{50} fue de 4.5 μM y un número de Hill de 2. Cada punto muestra la media de 3 a 8 células. *C-E*: se muestra el efecto de gadolinio 100 μM, ácido acetil salicílico (AAS) 100 μM y de acetato de plomo 10 μM sobre la corriente activada por pH 6.1. En *F*, la preaplicación de FMRFamida 100 μM durante 35 segundos incrementa la corriente al pico e inhibe la desensibilización de la corriente activada por protones en forma reversible sin afectar la corriente de sostenimiento. *G* y *H*: La coaplicación de zinc 300 μM y TPEN 10 μM incrementan la corriente al pico de forma significativa. Las líneas punteadas representan el cero de corriente, la calibración de *C* es la misma que para todos los registros.

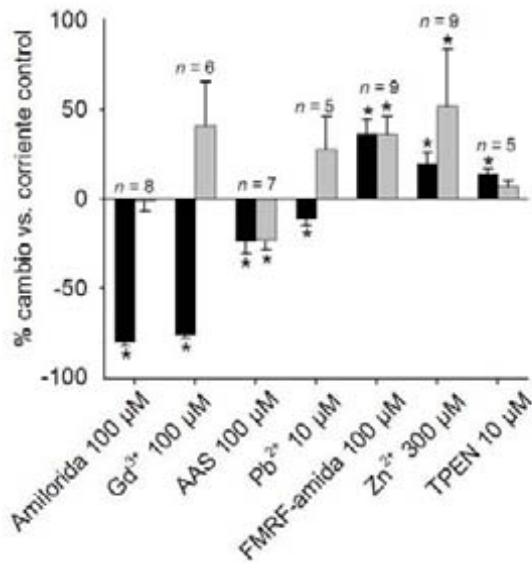


Figura 13. Farmacología de la corriente ASIC en neuronas aferentes vestibulares. Las barras representan la media \pm el error estándar de la magnitud al pico (barras negras) y de la corriente sostenida (barras grises) después de la coaplicación de cada fármaco. Los datos se presentan como porcentaje de cambio con respecto a la corriente control. Los asteriscos denotan significancia estadística ($P < 0.05$, prueba t de Student pareada).

Efecto de amilorida y cambios de pH en fijación de corriente

Cabe destacar que las neuronas que presentaron corrientes iónicas activadas por protones produjeron potenciales de acción en respuesta al cambio de pH extracelular (Fig. 14). El cambio de pH produjo una despolarización que fue seguida por el disparo de potenciales de acción de manera similar a como la neurona lo hizo con la inyección de pulsos cuadrados de corriente. La despolarización inducida por el pH ácido se redujo por la coaplicación del diurético amilorida en concentración 100 μ M ($n = 8$), caso en el cual la neurona ya no alcanzó el umbral de descarga del potencial de acción. Estos resultados sugieren de forma directa la posible participación de los ASIC en los procesos de codificación de la información sensorial.

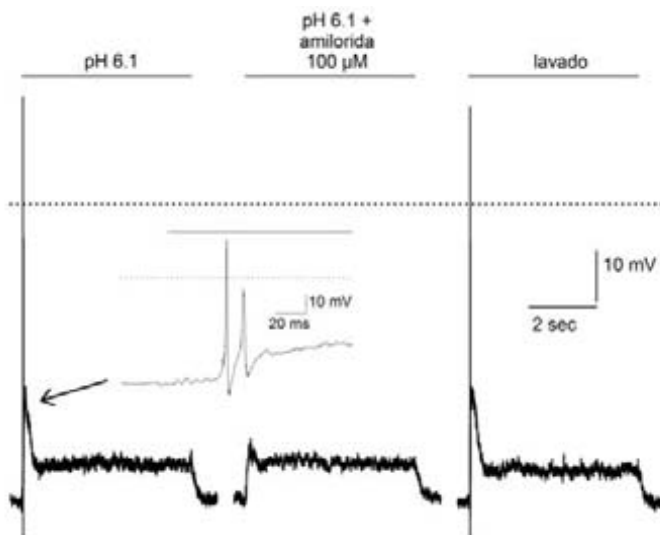


Figura 14. Efecto de pH y amilorida en la generación de potenciales de acción. En el trazo de la izquierda se muestra un registro control en que se observa el efecto de la perfusión de pH extracelular 6.1 (barra). Dicho cambio generó inicialmente la descarga de potenciales de acción y una despolarización sostenida durante la perfusión con pH ácido. En el trazo del centro se muestra en la misma neurona la coaplicación de pH 6.1 y amilorida (100 μ M), el pico inicial de la despolarización que da origen a los potenciales de acción se inhibe, y el trazo de la derecha es el lavado del fármaco. La línea punteada representa el cero de voltaje. El inserto muestra una ampliación del trazo control.

Para observar la distribución y expresión de las distintas subunidades ASIC que conforman el canal iónico activado por protones en las neuronas aferentes vestibulares, utilizamos técnicas inmunohistoquímicas. Se utilizaron anticuerpos específicos contra las subunidades ASIC1a, 1b, 2a, 2b, 3 y 4, los controles positivos se llevaron a cabo en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GDR) y en rebanadas de cerebelo (Fig. 15).

En secciones congeladas de oído interno de rata (de 14-20 μm de espesor) se encontró que ni las células ciliadas tipo I y II, ni las células de sostén del epitelio sensorial fueron inmunorreactivas para ninguna subunidad de los ASICs, lo que concuerda con la evidencia electrofisiológica que muestra que las células ciliadas no responden a los cambios de pH (Fig. 16A1-F1 y 16A2-F2). La inmunoreactividad específica provino de las neuronas del ganglio vestibular, en donde observamos que se encontraron las subunidades ASIC1a, 2a, 2b, 3 y 4 (16A y 16C-F). Adicionalmente se detectó que los anticuerpos contra ASIC1a y 2a tiñen procesos que corren a través de los epitelios sensoriales de la cresta de los canales semicirculares y del utrículo (Fig. 16 A1, C1 y A2, C2). Los cuerpos de las neuronas inmunorreactivas fueron medidos y su capacitancia fue estimada. Estas neuronas tuvieron un diámetro somático de $17 \pm 0.3 \mu\text{m}$ con somas que van de 10 a 25 μm de diámetro ($n = 166$). Los somas tienen una distribución de diámetros de tipo normal (no mostrado), y basado en esta medición, la media de la capacitancia de los cuerpos neuronales fue estimada en un $9 \pm 3 \text{ pF}$ (Fig. 17). Esta capacitancia es menor a la determinada electrofisiológicamente para las neuronas que presentaron corrientes iónicas activadas por protones ($18.8 \pm 0.7 \text{ pF}$). La discrepancia entre estos datos puede deberse al método que se utilizó para convertir área en capacitancia. Ya que como se ha descrito, la medición morfológica usando exclusivamente el diámetro como estimador tiende a subestimar la capacitancia ya que no considera en absoluto procesos celulares y tortuosidades de la membrana que en la fijación de voltaje sí contribuyen a la capacitancia (García-Pérez y cols., 2004).

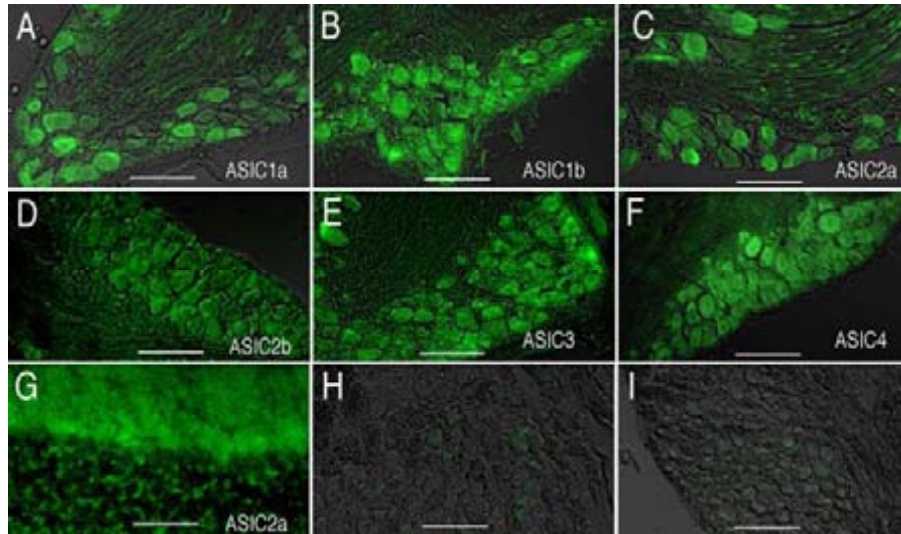


Figura 15. Inmunorreactividad de ASIC en los ganglios de la raíz dorsal y cerebelo. *A-F*: Inmunorreactividad de ASIC en los ganglios de la raíz dorsal. La subunidad que reconoce cada anticuerpo específico está marcada en cada micrografía. *G*: Inmunorreactividad de ASIC2a en corteza cerebelar. *H*: Control negativo de ASIC2a en ganglio vestibular, el anticuerpo primario fue preabsorbido con su correspondiente péptido inmunogénico en una relación de 1 μ g de anticuerpo por 1 μ g de péptido. En *I* control negativo de ASIC2a en ganglio vestibular, el anticuerpo primario fue omitido de la tinción. Las barras de calibración equivalen a: *A-F*, 90 μ m, *G*, 70 μ m y *H-I*, 100 μ m.

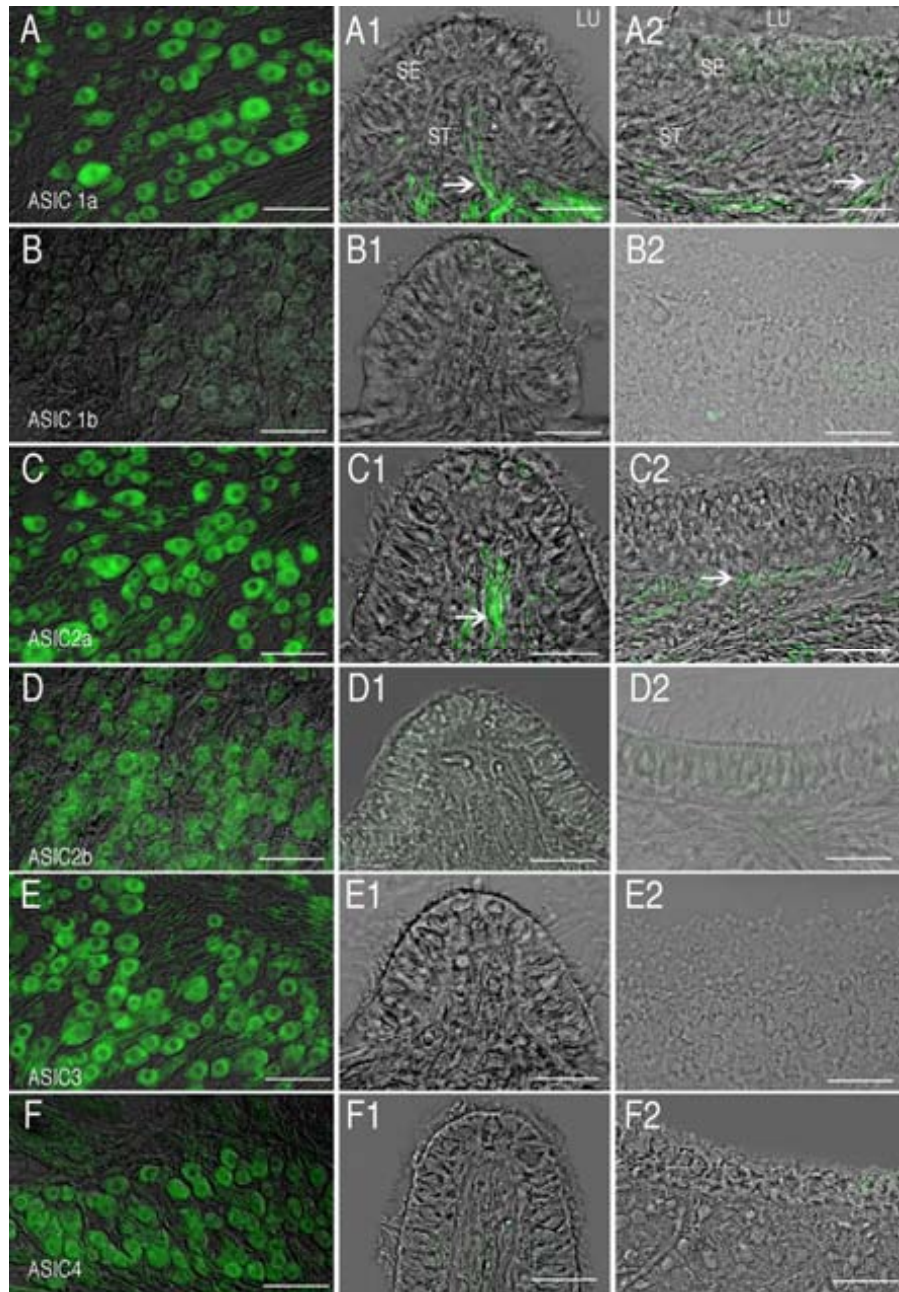


Figura 16. Inmunorreactividad de los diferentes ASIC en la periferia vestibular. *A-F* ganglio vestibular. *A1-F1* cresta de los canales semicirculares. *A2-F2* mácula utricular. El anticuerpo que fue utilizado contra cada subunidad está indicado en la micrografía de la izquierda (se utilizó el mismo para las micrografías marcadas con la misma letra). ASIC1b fue la única subunidad que no fue inmunorreactiva en la periferia vestibular. En fibras nerviosas que corren a través del estroma sólo fueron detectadas las subunidades ASIC1a y ASIC2a (flechas en A1, A2, C1, C2). SE = epitelio sensorial, ST = estroma, LU = lumen. Las barras de calibración equivalen a: *A-F* = 60 μm , *A1-F1* = 30 μm , *A2-F2* = 40 μm .

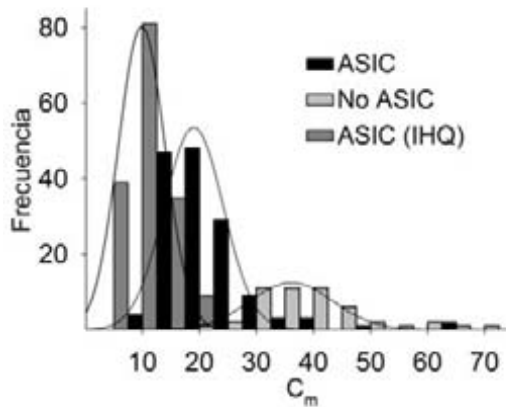


Figura 17. Distribución de capacitancias de las neuronas que presentaron (barras en gris claro) y que no presentaron (en negro) corrientes iónicas activadas por protones ($n = 146$ y 49 respectivamente). Las barras en gris oscuro (ASIC IHQ) representan la capacitancia estimada de las células inmunoreactivas a las distintas subunidades ASIC ($n = 166$). Para estas células la media de la capacitancia estimada fue de 9 ± 3 pF.

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se demuestra la presencia de una corriente iónica activada por protones extracelulares en neuronas aferentes vestibulares de la rata, que de acuerdo a la caracterización realizada es producida por la activación de canales tipo ASIC. Lo anterior se basa en la evidencia que se colectó a través del uso de técnicas de registro electrofisiológico, farmacológicas e inmunohistoquímicas del oído interno.

Características biofísicas

La activación rápida y desensibilización de la corriente evocada por pH 6.1 es la primera evidencia de que esta corriente iónica podría ser acarreada por canales tipo ASIC. La dinámica del proceso de activación que reportamos aquí, de alrededor de 10 ms tiene un valor cercano a lo reportado con anterioridad utilizando un sistema piezoeléctrico (con un retraso < 2 ms) para el intercambio de las soluciones (Bassler y cols., 2001). Sin embargo, la desensibilización rápida y casi completa de la corriente es el indicador más claro para sugerir la participación de canales iónicos tipo ASIC (Reeh y Kress, 2001). Por ejemplo, la cinética de la otra corriente activada por protones en las células de mamíferos, la de los TRPV1 es distinta; su activación dista mucho de producirse en el orden de centenas de milisegundos como ocurre con los ASIC, y su desensibilización es muy lenta e incompleta al paso de segundos (Tominaga y cols., 1998). Se debe hacer hincapié en que la desensibilización de la corriente ASIC de las neuronas aferentes vestibulares es rápida comparada con la que presentan los homómeros de la familia de los ASICs (Benson y cols., 2002; Hesselager y cols., 2004), sin embargo, cinéticas de desensibilización similares se presentan en canales heteromultiméricos. Por ejemplo, en el caso de las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (GRD) del ratón, se ha observado que las respuestas rápidas ante cambios en el pH extracelular se deben a la combinación de las subunidades ASIC1a, 2a y 3, los cuales tienen una constante de tiempo de desensibilización de

0.15 seg, que es similar a la que encontramos en las neuronas aferentes vestibulares (Benson y cols., 2002).

Otro factor que hace pensar que esta corriente iónica activada por protones es debida a la apertura de canales ASICs es que es acarreada de manera primordial por el ión sodio. Se ha reportado que el poro de conducción de los ASICs es altamente selectivo al sodio (cuando menos para la mayoría de las subunidades), a diferencia de las corrientes iónicas de los TRPV1, las cuales se ha llegado al consenso de que son catiónicas inespecíficas y que las corrientes de estos canales se deben en gran parte al flujo de calcio (Waldmann y Lazdunski, 1998; Szallasi y Blumberg, 1999). Por lo anterior, la manipulación del calcio extracelular se ha convertido en una herramienta útil en la diferenciación de los canales ASIC de otras corrientes iónicas activadas por protones. Desde su clonación se encontró que concentraciones altas de calcio extracelular bloqueaban la corriente iónica (Waldmann y cols., 1997a). Posteriormente se propuso un modelo de apertura de los ASIC en donde se desbloquea el poro abierto. Esta propuesta da cuenta de manera simple de las propiedades biofísicas de los ASICs y sugiere que estos canales se encuentran bloqueados por el calcio de manera constitutiva a pH fisiológico (Immke y McCleskey, 2003). En nuestras condiciones, encontramos que el incremento en el calcio extracelular desplaza a la derecha la curva de sensibilidad a los protones de la corriente iónica (sólo cambia el $pH_{0.5}$, manteniéndose sin cambio los demás parámetros del ajuste; ver Figura 7B), lo cual coincide con trabajos previos que estudian el proceso de activación (*gating*) del canal, donde se encontró que el aumento del calcio extracelular decrementa la sensibilidad a los protones de los ASIC (Immke y McCleskey, 2003). Hallazgos posteriores en cuanto al papel que juega el calcio sobre el *gating* del canal muestran que aún en ausencia de calcio extracelular ASIC1a sigue siendo activado por protones (Paukert y cols., 2004). Sin embargo, estos resultados no afectan la idea de que el calcio es un bloqueador de poro abierto, se sigue pensando que el calcio participa en la estabilización del estado cerrado bloqueando directamente el poro del canal ya que se demostró que el aumento de la concentración extracelular de calcio reduce la conductancia unitaria de ASIC1a, resultado que sugiere que el calcio obstruye la vía por donde pasan los iones (Paukert y cols., 2004).

Tomando en cuenta las características biofísicas de la corriente activada a pH 6.1, podemos sugerir con razonable certidumbre que la corriente iónica entrante que hemos registrado es debida a la expresión de heteromultímeros de ASIC. Dado que es necesaria la interacción entre ASIC1a, 2a y 3 para tener desensibilización rápida como la que obtuvimos y que el $pH_{0.5}$ que encontramos en las aferentes vestibulares se asemeja bastante al de ASIC1a ó 1b, sugerimos que los canales ASIC en el vestíbulo están conformados por subunidades ASIC1 (ya sea a o b), ASIC2 y ASIC3 (Benson y cols., 2002; Hesselager y cols., 2004).

Características farmacológicas

Encontramos que la corriente activada por protones de las aferentes vestibulares fue sensible a los distintos agentes farmacológicos que bloquean a los ASICs (Waldmann y cols., 1997; Bassilana y cols., 2000; Voilley y cols., 2001; Wang y cols., 2006), lo que corrobora que dicha corriente es debida a la apertura de canales tipo ASIC. De hecho, la curva dosis-respuesta a la amilorida muestra una sensibilidad marcada al diurético, aunque con amilorida no se obtuvo un bloqueo del 100% de la corriente con una dosis máxima de 100 μM , el bloqueo del 80% con esa dosis fue similar al obtenido en otros trabajos (Waldmann y cols., 1997a y 1997b). Para obtener un efecto inhibitor significativo de la corriente ASIC algunos autores utilizan dosis de hasta 1 mM (Waldmann y cols., 1997a) y para ciertas subunidades y combinaciones de ellas, por ejemplo monómeros de ASIC3, esta última concentración resulta en un bloqueo de alrededor del 80% (Waldmann y cols., 1997b). Las corrientes ASIC que desensibilizan menos resultan ser más resistentes al efecto de la amilorida. Sin embargo, en nuestros experimentos, el efecto robusto de la amilorida sobre el pico de la corriente activada por protones en las neuronas aferentes vestibulares indica que se trata de una corriente ASIC. En cambio, existen reportes en que la amilorida a dosis 200 μM no muestra ningún efecto sobre la corriente que pasa por canales TRPV1 (Ugawa y cols., 2002).

Evidencia adicional acerca de que la corriente activada por protones registrada en nuestras condiciones no fue debida a la apertura de canales TRPV1 fue el hecho de que al aplicar capsaicina a altas dosis (hasta 10 μM) no se observó ningún efecto sobre la corriente de mantenimiento (ver Figura 10). Se debe agregar que existe en la literatura un trabajo que describe que el Gd^{3+} en concentración 100 μM (misma concentración que la utilizada en esta tesis como bloqueador de los ASICs), es un activador de los canales TRPV1, lo que argumenta en favor de la ausencia de dichos canales y de que la corriente activada por pH 6.1 es una corriente tipo ASIC (Tousova y cols., 2005).

Por otro lado el zinc, que a altas concentraciones coactiva a ASIC2a (Baron y cols., 2001, Chu y cols., 2004), tuvo un efecto modesto pero significativo sobre la corriente evocada a pH 6.1, esto sugiere una participación de la subunidad ASIC2a en la formación del canal. Otro coactivador de los ASICs, el neuropéptido FMRF-amida modificó significativamente la cinética de la desensibilización de la corriente activada a pH 6.1; este resultado constituye una de las pruebas más convincentes de que la corriente se debe a la presencia de canales iónicos tipo ASIC (Askwith y cols., 2000; Deval y cols., 2003).

Otro efecto de bloqueo por zinc se ha reportado específicamente sobre canales ASIC1a, con efectos del catión en el orden nanomolar afectando un sitio de alta afinidad (Chu y cols., 2004). Añadiendo 10 mM de TPEN (un quelante de zinc) en la solución de perfusión evidenció una fracción de corriente activada por protones que presumimos era bloqueada por este metal. La fuente del zinc en nuestras soluciones, que inhibiría la corriente de forma tónica, podrían ser las

mismas sales (la mayoría de ellas cloruros) que presentan trazas de zinc y que alcanzan una concentración entre 20 a 50 nM de este metal (por ejemplo el reactivo ultrapuro de NaCl de la marca Sigma [S7653] contiene 0.0005 % de zinc) (Paoletti y cols., 1997). Este resultado apoyaría la idea de que ASIC1a está formando parte del canal las neuronas aferentes vestibulares.

El AAS (ácido acetilsalicílico) es un conocido bloqueador de la ciclo oxigenasa II (COX II), pero en años recientes ha sido descrito también como un bloqueador de baja afinidad de los ASICs. El AAS mostró un efecto inhibitorio moderado de la corriente activada por protones de las neuronas afrentes vestibulares a una concentración de 100 μ M, sin embargo, las concentraciones de AAS que se alcanzan en plasma a dosis terapéuticas (en el rango de 1-3 mM cuando se administra la dosis máxima) son lo suficientemente altas como para bloquear de manera casi completa a ciertas subunidades de los ASICs (Voilley y cols., 2001). Este podría ser un mecanismo adicional que explique la analgesia producida por el AAS y los inhibidores de la COX-II cuando se aplican de manera tópica, ya que hasta el momento no se sabe con certidumbre la manera en que medicamentos como el naproxeno o diclofenaco ejercen su efecto analgésico cuando se aplican por esta vía. Es de destacar que al ser aplicados tópicamente los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) alcanzan concentraciones de hasta 2 mM, que está por encima de la IC_{50} en la cual bloquean a los ASIC (Voilley y cols., 2001). En los casos de intoxicación por AINES cuyos síntomas característicos involucran de manera muy directa al oído interno (tinitus y vértigo) (Cazals, 2000), estos podrían ser, al menos en parte, originados por el bloqueo de los ASICs que parecen participar activamente en la transmisión sináptica de las aferentes vestibulares y en la generación de potenciales de acción en las neuronas aferentes que los presentan (ver sección referente al *Papel fisiológico*).

La intoxicación por plomo produce algunos síntomas que pueden tener su origen en una disfunción vestibular (Garza y cols., 2006). Las concentraciones plasmáticas que se consideran severamente tóxicas son de alrededor de 1 μ M, dicha concentración tiene un efecto muy modesto sobre la corriente ASIC1a expresada en sistemas heterólogos, sin embargo la concentración plasmática puede no reflejar la acumulación de este metal en los tejidos, en donde se ha visto que el tejido nervioso es especialmente susceptible de concentrar altas cantidades del metal (Garza y cols., 2006). En este trabajo se evaluó una concentración de 10 μ M, y aunque el efecto de bloqueo que tuvo sobre los ASIC de las neuronas aferentes vestibulares es relativamente pequeño, se puede especular que pudiera producir algunos de los síntomas tóxicos de este metal, especialmente los de mareo y el vértigo, además de otros efectos neurotóxicos ya conocidos que a nivel celular incluyen bloqueo de canales de calcio, ocupación de sitios activos para cationes divalentes, etc.

En conjunto, con base en el análisis de la sensibilidad farmacológica de la corriente, podemos concluir que la corriente iónica entrante activada por protones en las neuronas

aferentes vestibulares es producida principalmente por la activación de canales tipo ASIC, y que en la formación de dichos canales podría participar la subunidad ASIC2. Desde el punto de vista farmacológico no es posible obtener información adicional acerca de las subunidades que forman el canal expresado en las neuronas aferentes vestibulares.

Inmuhistoquímica del oído interno

De trabajos previos, se sabía de la presencia de ASICs en el oído interno, en específico de las subunidades ASIC4 clonada de la cóclea y vestíbulo de la rata (Grunder y cols., 2000), la ASIC2 de la cóclea y vestíbulo de ratón detectada por inmunohistoquímicas (Peng y cols., 2004) y ASIC3 de la cóclea del ratón detectada por RT-PCR e inmuhistoquímica (Hildebrand y cols., 2004). También se había clonado la subunidad ASIC1b de una biblioteca de cDNA específica del sistema vestibular de la rata (Bassler y cols., 2001). En el presente trabajo mediante la inmuhistoquímica encontramos una expresión prominente de ASIC1a que coincide bien con el $pH_{0.5}$ y el número de Hill que obtuvimos en las curvas dosis-respuesta (Waldmann y cols., 1997; Benson y cols., 2002; Heselager y cols., 2004). El incremento en la corriente ASIC que se obtuvo con la coaplicación de zinc es consistente con la inmunorreactividad específica para la subunidad ASIC2a (Baron y cols., 2001; Chu y cols., 2004). Mientras que, la cinética rápida de la corriente coincide con la expresión de ASIC3 (Benson y cols., 2002).

A diferencia de lo reportado por Balaban y colaboradores (2003) quienes observan inmunorreactividad en las neuronas aferentes vestibulares (presumiblemente en membranas internas) y pudieron amplificar por RT-PCR el mensajero del TRPV1 proveniente del ganglio vestibular completo, en nuestras condiciones, no pudimos registrar corrientes atribuibles a la activación del TRPV1, por lo que concluimos que dicho receptor no se expresó funcionalmente en la membrana de las neuronas aferentes vestibulares.

Por otra parte, la ausencia de corrientes iónicas producidas por protones en las células ciliadas aisladas, coincide con el hecho de que en la inmunohistoquímica no se detectó ningún tipo de marcaje en dichas células. Esto coincide también con reportes previos en la literatura en que los autores no encuentran marca para ASICs o TRPV1 en las células ciliadas (Balaban y cols., 2003; Peng y cols., 2004).

Papel fisiológico

Las neuronas aferentes vestibulares de la rata que presentaron la corriente ASIC dispararon potenciales de acción cuando el pH extracelular fue acidificado rápidamente, este fenómeno ya ha sido observado en otras preparaciones como lo son las neuronas de la corteza cerebral, las piramidales CA1 del hipocampo y las de los ganglios de la raíz dorsal (Varming, 1999; Baron y cols., 2002; Deval y cols., 2003; Vukicevic y Kellenberger, 2004). En la mayoría de estos reportes esta actividad ha sido interpretada como una respuesta ante un estímulo nocivo para la

neurona; sin embargo se ha propuesto un cambio de enfoque, en el que la activación de los ASICs podría tener un papel en la transmisión sináptica (Bianchi y Drischoll, 2002; Wemmie y cols., 2002). Se ha discutido que los ASICs, por sus características, puedan ser considerados como un receptor postsináptico excitatorio, de manera similar a los receptores a acetilcolina o glutamato. Los ASIC muestran la mayoría de las características de los receptores postsinápticos excitatorios: se activan en el rango micromolar bajo, muestran cinética de desensibilización evidente y su corriente catiónica (acarreada principalmente por sodio) despolariza a la neurona que presenta estos receptores. Por otro lado, la interacción protones-ASICs tiene una cinética de interacción ligando receptor que resulta ser la más simple que se ha encontrado en la naturaleza (Krishtal, 2003). Se especula que en cierto contexto los protones en interacción con los ASIC pueden participar en la neurotransmisión en condiciones fisiológicas, interactuando con algunos otros receptores (como el NMDA) complementando la transmisión sináptica (Bianchi y Drischoll, 2002). En el trabajo de Beg y cols. (2008), se describe que para que una acidificación intensa del espacio sináptico, active de manera efectiva receptores ionotrópicos activados por protones es necesaria la presencia de un intercambiador Na^+/H^+ . En sinapsis del sistema nervioso esto parece una condición necesaria ya que ante la entrada de calcio en la terminal presináptica sólo se liberan una o dos vesículas sinápticas. Sin embargo, en las sinapsis en forma de listón existe una gran cantidad de vesículas listas para ser liberadas, por lo que el intercambiador puede no ser necesario para una acidificación significativa del espacio sináptico que pudiera activar receptores postsinápticos (Sterling y Matthews, 2005). Pese a lo anterior, en la membrana basolateral de la célula ciliada de rana ha sido descrita la isoforma NHE1 del intercambiador Na^+/H^+ , que probablemente estuviera teniendo algún tipo de participación en la acidificación del espacio sináptico, independiente del papel en la homeostasis del espacio intracelular que se le ha atribuido (Hill y cols., 2006).

En el caso de las neuronas aferentes vestibulares podemos sugerir que uno de los efectos fisiológicos de la activación de los ASICs sería el ajustar la dinámica de disparo de estas neuronas, posiblemente despolarizando directamente la neurona aferente ante la acumulación de protones en el espacio sináptico, ya sean provenientes de la vesículas de glutamato o expulsados de las células ciliadas a través de una ATPasa de Na^+/H^+ . Cabe aclarar que estas dos últimas posibilidades de liberación de H^+ al espacio sináptico aún no han podido ser demostradas en sinapsis de mamíferos. Sin embargo, los cambios de pH en condiciones experimentales generaron -por si solos- potenciales de acción, lo que deja abierta la posibilidad de que bajo las condiciones adecuadas (un cambio de pH en el medio extracelular o la liberación de péptidos relacionados con la FMRF-amida sobre la neurona aferente vestibular que inhiban la desensibilización de los ASIC) se pueda generar una corriente iónica mediada por ASICs suficiente para despolarizar a las neuronas aferentes.

Por otro lado, el patrón de expresión de los ASICs se restringió a las neuronas de menor capacitancia; esto último puede tener importantes implicaciones funcionales, ya que dicho tipo de neuronas son las que inervan a las células ciliadas tipo II y presentan un patrón de descarga regular de potenciales de acción, diferentes desde el punto de vista morfológico y de su descarga a las neuronas que inervan las células ciliadas tipo I (Leonard y Kevetter, 2002; Goldberg; 2000). La presencia de los ASIC en estas neuronas de menor tamaño puede incrementar su entrada sináptica y a su vez el patrón de su descarga. La misma distribución asimétrica de canales iónicos en las neuronas aferentes vestibulares de distinto tamaño ha sido identificada para canales como los de potasio activados por calcio (I_{KCa}) y los canales de calcio activados por voltaje de bajo umbral (Limón y cols., 2005). En el caso de la I_{KCa} se encontró que la densidad de su corriente es 4 veces más grande en las células pequeñas que en las de mayor diámetro. Esta corriente influye sobre la posthiperpolarización de manera significativa en las neuronas de menor tamaño, lo que sin duda tiene un impacto profundo en la regularidad de estas neuronas (Limón y cols., 2005). En el caso de los ASIC, no tenemos la misma certidumbre sobre la influencia que puedan tener sobre la descarga de las neuronas que las expresan, sin embargo, debido a su expresión restringida y a que conducen una corriente despolarizante es que proponemos que actúan directamente en la determinación de la magnitud de la entrada sináptica junto con los receptores a aminoácidos excitadores que se reconocen como el neurotransmisor de esta sinapsis (Soto y cols., 1988).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis señalan el tipo de experimentos que deben diseñarse en el futuro, que tengan específicamente el objetivo de hacer una evaluación amplia del papel de los ASICs en la descarga de las neuronas aferentes vestibulares. El diseño experimental debe de conducirse de manera cuidadosa, debido a la carencia de herramientas farmacológicas específicas accesibles en el mercado para el bloqueo de los ASICs (Krishtal, 2003). Cabe destacar que resultados preliminares de nuestro laboratorio nos han permitido demostrar en una preparación del vestíbulo aislado tanto del axolotl como de la rata que la FMRFamida produce un efecto significativo sobre el patrón de descarga de las neuronas aferentes vestibulares, hecho que indica que los ASIC se pueden encontrar tónicamente activos y que probablemente participan en la generación de la descarga basal de dichas neuronas aferentes (Mercado y cols., 2006).

CONCLUSIÓN

Las neuronas aferentes vestibulares presentan una conductancia iónica activada por protones extracelulares, dicha corriente es acarreada a través de canales iónicos de la familia de los ASICs, conformados aparentemente por las subunidades ASIC1a, 2 y 3. La expresión de esta corriente está restringida a las neuronas de menor capacitancia, lo que sugiere que se encuentran expresados en las neuronas de diámetro somático pequeño, con axones delgados y con terminales en forma de botón. Su papel funcional puede estar relacionado con el ajuste de la excitabilidad y del patrón de descarga de las neuronas vestibulares, aunque debe considerarse la posibilidad de que jueguen también un papel de orden metabólico. Los ASICs pudieran tener también una participación relevante en algunos procesos patológicos que se acompañan de desequilibrio ácido básico y que afectan a los órganos vestibulares, como ha sido demostrado en la enfermedad de Ménière (Celestino y cols., 1976) y en la intoxicación por AAS que se caracteriza entre otros síntomas por tinnitus y vértigo (Cazals, 2000).

BIBLIOGRAFÍA

- Abdrakhmanova G, Dorfman J, Xiao Y, Morad M. (2002) Protons enhance the gating kinetics of the $\alpha 3/\beta 4$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor by increasing its apparent affinity to agonists. *Mol Pharmacol*. 61: 369-378.
- Andrianov GN, Ryzhova IV. (1999) Opioid peptides as possible neuromodulators of the afferent synaptic transmission in the frog semicircular canal. *Neuroscience*. 93: 801-806.
- Akopian AN, Chen CC, Ding Y, Cesare P, Wood JN. (2000) A new member of the acid-sensing ion channel family. *Neuroreport*. 11: 2217-2222.
- Allen NJ, Attwell D. (2002) Modulation of ASIC channels in rat cerebellar Purkinje neurons by ischaemia-related signals. *J Physiol*. 543: 521-529.
- Almanza, A, Vega, R, Soto, E. (2003) Calcium current in type I hair cells isolated from the semicircular canal crista ampullaris of the rat. *Brain Res*. 994: 175-180.
- Anniko, M. (1988) Functional morphology of the vestibular system. En: *Physiology of the ear*, (Ed) Jhan, A.F., Sacchi, S. Raven Press, New York, 457-472.
- Anumonwo JM, Horta J, Delmar M, Taffet SM, Jalife J. (1999) Proton and zinc effects on HERG currents. *Biophys J*. 77: 282-298.
- Askwith CC, Cheng C, Ikuma M, Benson C, Price MP, Welsh MJ. (2000) Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels. *Neuron*. 26: 133-141.
- Assad JA, Shepherd GM, Corey DP. (1991) Tip-link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells. *Neuron*. 7: 985-994.
- Babinski K, Catarsi S, Biagini G, Seguela P. (2000) Mammalian ASIC2a and ASIC3 subunits co-assemble into heteromeric proton-gated channels sensitive to Gd^{3+} . *J Biol Chem*. 275: 28519-28525.
- Balaban CD, Zhou J, Li HS. (2003) Type 1 vanilloid receptor expression by mammalian inner ear ganglion cells. *Hear Res*. 175: 165-170.
- Baron A, Schaefer L, Lingueglia E, Champigny G, Lazdunski M. (2001) Zn^{2+} and H^+ are coactivators of acid-sensing ion channels. *J Biol Chem*. 276: 35361-35367.
- Baron A, Waldmann R, Lazdunski M. (2002) ASIC-like, proton-activated currents in rat hippocampal neurons. *J Physiol*. 539: 485-494.
- Bässler EL, Ngo-Anh TJ, Geisler HS, Ruppertsberg JP, Grunder S. (2001) Molecular and functional characterization of acid sensing ion channel (ASIC) 1b. *J Biol Chem*. 276: 33782-33787.
- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D. (2006) TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*. 124: 1269-1282.
- Beg AA, Ernstrom GG, Nix P, Davis MW, Jorgensen EM. (2008) Protons act as a transmitter for muscle contraction in *C. elegans*. *Cell*. 132: 149-160.

- Benson CJ, Xie J, Wemmie JA, Price MP, Henss JM, Welsh MJ, Snyder PM. (2002) Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺ gated channels in mouse sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci.* 99: 2338-2343.
- Bianchi L, Driscoll M. (2002) Protons at the gate: DEG/ENaC ion channels help us feel and remember. *Neuron.* 34: 337-340.
- Bocquet N, Nury H, Baaden M, Le Poupon C, Changeux JP, Delarue M, Corringer PJ. (2009) X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature.* 457: 111-114.
- Bocquet N, Prado de Carvalho L, Cartaud J, Neyton J, Le Poupon C, Taly A, Grutter T, Changeux JP, Corringer PJ. (2007) A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family. *Nature.* 445: 116-119.
- Bolshakov KV, Essin KV, Buldakova SL, Dorofeeva NA, Skatchkov SN, Eaton MJ, Tikhonov DB, Magazanik LG. (2002) Characterization of acid-sensitive ion channels in freshly isolated rat brain neurons. *Neuroscience.* 110: 723-730.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389: 816-824.
- Cazals Y. (2000) Auditory sensori-neural alterations induced by salicylate. *Prog Neurobiol.* 62: 583-631.
- Celestino D, Cerulli N, Iannetti G, Sagliaschi G. (1976) Acid-base equilibrium in Ménière's disease. *J Laryngol Otol.* 90: 263-275.
- Chabbert C, Mechaly I, Sieso V, Giraud P, Brugeaud A, Lehouelleur J, Couraud F, Valmier J, Sans A. (2003) Voltage-gated Na⁺ channel activation induces both action potentials in utricular hair cells and brain-derived neurotrophic factor release in the rat utricle during a restricted period of development. *J Physiol.* 553: 113-123.
- Chen CC, England S, Akopian AN, Wood JN. (1998) A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci.* 95: 10240-10245.
- Chen X, Gründer S. (2007) Permeating protons contribute to tachyphylaxis of the acid-sensing ion channel (ASIC) 1a. *J Physiol.* 579: 657-670.
- Chen X, Kalbacher H, Gründer S. (2005) The tarantula toxin psalmotoxin 1 inhibits acid-sensing ion channel (ASIC) 1a by increasing its apparent H⁺ affinity. *J Gen Physiol.* 126: 71-79.
- Chen X, Kalbacher H, Gründer S. (2006) Interaction of acid-sensing ion channel (ASIC) 1 with the tarantula toxin psalmotoxin 1 is state dependent. *J Gen Physiol.* 127: 267-276.
- Chen X, Paukert M, Kadurin I, Pusch M, Gründer S. (2006b) Strong modulation by RFamide neuropeptides of the ASIC1b/3 heteromer in competition with extracellular calcium. *Neuropharmacology.* 50: 964-974.
- Chu XP, Wemmie JA, Wang WZ, Zhu XM, Saugstad JA, Price MP, Simon RP, Xiong ZG. (2004) Subunit-dependent highaffinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels. *J Neurosci.* 24: 8678-8689.
- Clapham D. (2003) TRP as cellular sensors. *Nature.* 426: 517-524.

Claydon TW, Boyett MR, Sivaprasadarao A, Ishii K, Owen JM, O'Beirne HA, Leach R, Komukai K, Orchard CH. Inhibition of the K⁺ channel Kv1.4 by acidosis: protonation of an extracellular histidine slows the recovery from N type inactivation. *J Physiol.* 2000 Jul 15;526 Pt 2:253-64.

Corey DP. (2003) New TRP channels in hearing and mechanosensation. *Neuron.* 39: 585-588.

Corey DP, García-Añoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Géléoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS. (2004) TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature.* 432: 723-730.

Corey DP, Hudspeth AJ. (1979) Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell. *Nature.* 281: 675-677.

Coscoy S, Lingueglia E, Lazdunski M, Barbry P. (1998) The Phe-Met-Arg-Phe-amide-activated sodium channel is a tetramer. *J Biol Chem.* 273: 8317-8322.

Couloigner V, Fay M, Djelidi S, Farman N, Escoubet B, Runembert I, Sterkers O, Friedlander G, Ferrary E. (2001) Location and function of the epithelial Na channel in the cochlea. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280: 214-222.

Crawford AC, Evans MG, Fettiplace R. (1991) The actions of calcium on the mechano-electrical transducer current of turtle hair cells. *J Physiol.* 434: 369-398.

Dayanithi G, Desmadryl G, Travo C, Chabbert C, Sans A. (2007) Trimetazidine modulates AMPA/kainate receptors in rat vestibular ganglion neurons. *Eur J Pharmacol.* 574: 8-14.

Deval E, Baron A, Lingueglia E, Mazarguil H, Zajac JM, Lazdunski M. (2003) Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology.* 44: 662-671.

DeVries SH. (2001) Exocytosed protons feedback to suppress the Ca²⁺ current in mammalian cone photoreceptors. *Neuron.* 32: 1107-1117.

Diochot S, Baron A, Rash LD, Deval E, Escoubas P, Scarzello S, Salinas M, Lazdunski M. (2004) A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J.* 23: 1516-1525.

Donier E, Rugiero F, Jacob C, Wood JN. (2008) Regulation of ASIC activity by ASIC4: new insights into ASIC channel function revealed by a yeast two-hybrid assay. *Eur J Neurosci.* 28: 74-86.

Dube GR, Lehto SG, Breese NM, Baker SJ, Wang X, Matulenko MA, Honore P, Stewart AO, Moreland RB, Brioni JD. (2005) Electrophysiological and in vivo characterization of A-317567, a novel blocker of acid sensing ion channels. *Pain.* 117: 88-96.

Escoubas P, De Weille JR, Lecoq A, Diochot S, Waldmann R, Champigny G, Moinier D, Menez A, Lazdunski M. (2000) Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *J Biol Chem.* 275: 25116-25121.

Flores A, Leon-Olea M, Vega R, Soto E. (1996) Histochemistry and role of nitric oxide synthase in the amphibian (*Ambystoma tigrinum*) inner ear. *Neurosci Lett.* 205: 131-134.

- Flores A, Soto E, Vega R. (2001) Nitric oxide in the afferent synaptic transmission of the axolotl vestibular system. *Neuroscience*. 103: 457-464.
- Friese MA, Craner MJ, Etzensperger R, Vergo S, Wemmie JA, Welsh MJ, Vincent A, Fugger L. (2007) Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat Med*. 13: 1483-1489.
- García-Pérez E, Vargas-Caballero M, Velazquez-Ulloa N, Minzoni A, De-Miguel FF. (2004) Synaptic integration in electrically coupled neurons. *Biophys J*. 86: 646-655.
- Garza-Carbajal A. (2007) Lead inhibits proton gated currents (ASIC) in dorsal root ganglion neurons *Gac Med Mex*. 143: 131-135.
- Garza A, Vega R, Soto E. (2006) Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med Sci Monit*. 12: 57-65.
- Goldberg JM. (2000) Afferent diversity and the organization of central vestibular pathways. *Exp Brain Res*. 130: 277-297.
- Goldberg JM, Fernandez C. (1980) Efferent vestibular system in the squirrel monkey: anatomical location and influence on afferent activity. *J Neurophysiol*. 43: 986-1025.
- Glowatzki E, Fuchs PA. (2002) Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci*. 5: 147-154.
- Grunder S, Geissler HS, Bassler EL, Ruppertsberg JP. (2000) A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. *Neuroreport*. 11: 1607-1611.
- Grunder S, Muller A, Ruppertsberg JP. (2001) Developmental and cellular expression pattern of epithelial sodium channel alpha, beta and gamma subunits in the inner ear of the rat. *Eur J Neurosci*. 13: 641-648.
- Guth P, Perin P, Norris CH, Valli P. (1998) The vestibular hair cell: postransductional signal processing. *Prog Neurobiol*. 54: 193-247.
- Hesselager M, Timmermann DB, Ahring PK. (2004) pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits. *J Biol Chem*. 279: 11006-11015.
- Hildebrand MS, de Silva MG, Klockars T, Rose E, Price M, Smith RJ, McGuirt WT, Christopoulos H, Petit C, Dahl HH. (2004) Characterisation of DRASIC in the mouse inner ear. *Hear Res*. 190: 149-160.
- Hilf RJ, Dutzler R. (2009) Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature*. 457: 115-118.
- Hill JK, Brett CL, Chyou A, Kallay LM, Sakaguchi M, Rao R, Gillespie PG. (2006) Vestibular hair bundles control pH with $(\text{Na}^+, \text{K}^+)/\text{H}^+$ exchangers NHE6 and NHE9. *J Neurosci*. 26: 9944-9955.
- Hoger U, French AS. (2002) Extracellular acid increases the open probability of transduction channels in spider mechanoreceptors. *Eur J Neurosci*. 16: 2311-2316.
- Holt JR, Corey DP. (2000) Two mechanisms for transducer adaptation in vertebrate hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 11730-11735.

- Hosoi N, Arai I, Tachibana M. (2005) Group III metabotropic glutamate receptors and exocytosed protons inhibit L-type calcium currents in cones but not in rods. *J Neurosci.* 25: 4062-4072.
- Howard J, Bechstet S. (2004) Hypothesis: a helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors. *Curr Biol.* 14: 224-226.
- Huang CQ, Carter PM, Shepherd RK. (2001) Stimulus induced pH changes in cochlear implants: an in vitro and in vivo study. *Ann Biomed Eng.* 29: 791-802.
- Hudspeth AJ, Corey DP. (1977) Sensitivity, polarity, and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74: 2407-2411.
- Hudspeth AJ, Jacobs R. (1979) Stereocilia mediate transduction in vertebrate hair cells (auditory system/cilium/vestibular system). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76: 1506-1509.
- Hurley KM, Gaboyard S, Zhong M, Price SD, Wooltorton JR, Lysakowski A, Eatock RA. (2006) M-like K⁺ currents in type I hair cells and calyx afferent endings of the developing rat utricle. *J Neurosci.* 26: 10253-10269.
- Ihle EC, Patneau DK. (2000) Modulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor desensitization by extracellular protons. *Mol Pharmacol.* 58: 1204-1212.
- Immke DC, McCleskey EW. (2003) Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca²⁺ blockade. *Neuron.* 37: 75-84.
- Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E. (2007) Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature.* 449: 316-323.
- Jorgensen F, Ohmori H. (1988) Amiloride blocks the mechano-electrical transduction channel of hair cells of the chick. *J Physiol.* 403: 577-588.
- Kachar B, Parakkal M, Kurc M, Zhao Y, Gillespie PG. (2000) High-resolution structure of hair-cell tip links. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 13336-13341.
- Kazmierczak P, Sakaguchi H, Tokita J, Wilson-Kubalek EM, Milligan RA, Müller U, Kachar B. (2007) Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature.* 449: 87-91.
- Kehl SJ, Eduljee C, Kwan DC, Zhang S, Fedida D. (2002) Molecular determinants of the inhibition of human Kv1.5 potassium currents by external protons and Zn²⁺. *J Physiol.* 541: 9-24.
- Kellenberger S, Schild L. (2002) Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev.* 82: 735-767.
- Krishek BJ, Smart TG. (2001) Proton sensitivity of rat cerebellar granule cell GABA-A receptors: dependence on neuronal development. *J Physiol.* 530: 219-233.
- Krishtal O. (2003) The ASICs: signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci.* 26: 477-483.

- Krishtal OA, Osipchuk YV, Shelest TN, Smirnov SV. (1987) Rapid extracellular pH transients related to synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 436: 352-356.
- Krishtal OA, Pidoplichko VI. (1981) A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception. *Neuroscience.* 6: 2599-2601.
- Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP. (2006) TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron.* 50: 277-289.
- Lefèvre G, Michel V, Weil D, Lepelletier L, Bizard E, Wolfrum U, Hardelin JP, Petit C. (2008) A core cochlear phenotype in USH1 mouse mutants implicates fibrous links of the hair bundle in its cohesion, orientation and differential growth. *Development.* 135: 1427-1437.
- Leonard RB, Kvetter GA. (2002) Molecular probes of the vestibular nerve I. Peripheral termination patterns of calretinin, calbindin and peripherin containing fibers. *Brain Res.* 928: 8-17.
- Laurido C, Candia S, Wolff D, Latorre R. (1991) Proton modulation of a Ca^{2+} -activated K^+ channel from rat skeletal muscle incorporated into planar bilayers. *J Gen Physiol.* 98: 1025-1042.
- Leach R, Komukai K, Orchard CH. (2000) Inhibition of the K^+ channel Kv1.4 by acidosis: protonation of an extracellular histidine slows the recovery from N-type inactivation. *J Physiol.* 526: 253-264.
- Lesage F, Lazdunski M. (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol.* 279: 793-801.
- Lilley S, LeTissier P, Robbins J. (2004) The discovery and characterization of a proton-gated sodium current in rat retinal ganglion cells. *J Neuroscience.* 24: 1013-1022.
- Limón A, Pérez C, Vega R, Soto E. (2005) Ca^{2+} -activated K^+ -current density is correlated with soma size in rat vestibular-afferent neurons in culture. *J Neurophysiol.* 94: 3751-3761.
- Lingueglia E, de Weille JR, Bassilana F, Heurteaux C, Sakai H, Waldmann R, Lazdunski M. (1997) A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. *J Biol Chem.* 272: 29778-29783.
- Lopes CM, Zilberberg N, Goldstein SA. (2001) Block of Kcnk3 by protons. Evidence that 2-P-domain potassium channel subunits function as homodimers. *J Biol Chem.* 276: 24449-24452.
- Lopez IA, Acuna D, Galbraith G, Bok D, Ishiyama A, Liu W, Kurtz I. (2005) Time course of auditory impairment in mice lacking the electroneutral sodium bicarbonate cotransporter NBC3 (slc4a7). *Brain Res Dev Brain Res.* 160: 63-77.
- Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, Hofstetter H, Wolf RM, Seuwen K. (2003) Proton sensing G-protein-coupled receptors. *Nature.* 425: 93-98.
- Marcotti W, Johnson SL, Rusch A, Kros CJ. (2003) Sodium and calcium currents shape action potentials in immature mouse inner hair cells. *J Physiol.* 552: 743-761.
- Masetto S, Bosica M, Correia MJ, Ottersen OP, Zucca G, Perin P, Valli P. (2003) Na^+ currents in vestibular type I and type II hair cells of the embryo and adult chicken. *J Neurophysiol.* 90: 1266-1278.

- Mazucca M, Heurteaux C, Alloui A, Diochot S, Baron A, Voilley N, Blondeau N, Escoubas P, Gélot A, Cupo A, Zimmer A, Zimmer AM, Eschalié A, Lazdunski M. (2007) A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat Neurosci.* 10: 943-945.
- Meltzer RH, Kapoor N, Qadri YJ, Anderson SJ, Fuller CM, Benos DJ. (2007) Heteromeric assembly of acid-sensitive ion channel and epithelial sodium channel subunits. *J Biol Chem.* 282: 25548-25559.
- Mercado FS, Ortega A, Vega R, Soto E. (2006) Acid-sensing ionic channels (ASIC) synaptic activation contributes to the resting discharge of vestibular afferent neurons. *36th Neurosci Meeting*. Poster 140.9/E5.
- Meyers JR, MacDonald RB, Duggan A, Lenzi D, Standaert DG, Corwin JT, Corey DP. (2003) Lighting up the senses: FM1-43 loading of sensory cells through nonselective ion channels. *J Neurosci.* 23: 4054-4065.
- Mhatre AN, Li J, Chen AF, Yost CS, Smith RJ, Kindler CH, Lalwani AK. (2004) Genomic structure, cochlear expression, and mutation screening of KCNK6, a candidate gene for DFNA4. *J Neurosci Res.* 75: 25-31.
- Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE. (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature.* 394: 192-195.
- Moser T, Neef A, Khimich D. (2006) Mechanisms underlying the temporal precision of sound coding at the inner hair cell ribbon synapse. *J Physiol.* 576: 55-62.
- Nicolas MT, Barhanin J, Reyes R, Dememes D. (2003) Cellular localization of TWIK-1, a two-pore-domain potassium channel in the rodent inner ear. *Hear Res.* 181: 20-26.
- Nouvian R, Beutner D, Parsons TD, Moser T. (2006) Structure and function of the hair cell ribbon synapse. *J Membr Biol.* 209: 153-165.
- Palmer MJ, Hull C, von Gersdorff JV. (2003) Synaptic Cleft Acidification and Modulation of Short-Term Depression by Exocytosed Protons in Retinal Bipolar Cells. *J Neurosci.* 23: 11332-11341.
- Panula P, Kalso E, Nieminen M, Kontinen VK, Brandt A, Pertovaara A. (1999) Neuropeptide-FF and modulation of pain. *Brain Res.* 848: 191-196.
- Paoletti P, Ascher P, Neyton J. (1997) High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci.* 17: 5711-5725.
- Patel AJ, Honore E. (2001) Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci.* 24: 339-346.
- Patel AJ, Lazdunski M. (2004) The 2P-domain K⁺ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers Arch.* 448: 261-273.
- Paukert M, Babini E, Pusch M, Gründer S. (2004) Identification of the Ca²⁺ blocking site of acid-sensing ion channel (ASIC) 1: implications for channel gating. *J Gen Physiol.* 124: 383-394.
- Paukert M, Chen X, Polleichtner G, Schindelin H, Gründer S. (2008) Candidate amino acids involved in H⁺ gating of acid-sensing ion channel 1a. *J Biol Chem.* 283: 572-581.

- Peng BG, Ahmad S, Chen S, Price MP, Lin X. (2004) Acid-sensing ion channel 2 contributes a major component to acid-evoked responses in spiral ganglion neurons and plays a role in noise susceptibility of Mice. *J Neurosci.* 24: 10167-10175.
- Peretz A, Schottelndreier H, Aharon-Shamgar LB, Attali B. (2002) Modulation of homomeric and heteromeric KCNQ1 channels by external acidification. *J Physiol.* 545: 751-766.
- Perez C, Limón A, Vega R y Soto E. (2009) The muscarinic inhibition of the potassium M-current modulates the action-potential discharge in the vestibular primary-afferent neurons of the rat. *Neuroscience.* 158: 1662-1674.
- Pickles JO, Comis SD, Osborne MP. (1984) Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hear Res.* 15: 103-112.
- Pickles JO, Corey DP. (1992) Mechano-electrical transduction by hair cells. *Trends Neurosci.* 15: 254-259.
- Pidoplichko VI, Dani JA. (2006) Acid-sensitive ionic channels in midbrain dopamine neurons are sensitive to ammonium, which may contribute to hyperammonemia damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 11376-11380.
- Popper P, Winkler J, Erbe CB, Lerch-Gaggl A, Siebeneich W, Wackym PA. (2008) Distribution of two-pore-domain potassium channels in the adult rat vestibular periphery. *Hear Res.* 246: 1-8.
- Price MP, McIlwrath SL, Xie J, Cheng C, Qiao J, Tarr DE, Sluka KA, Brennan TJ, Lewin GR, Welsh MJ. (2001) The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron.* 32: 1071-1083.
- Price MP, Snyder PM, Welsh MJ. (1996) Cloning and expression of a novel human brain Na⁺ channel. *J Biol Chem.* 271: 7879-7882.
- Reeh PW, Kress M. (2001) Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. *Curr Opin Pharmacol.* 1: 45-51.
- Ricci AJ, Kachar B, Gale J, Van Netten SM. (2006) Mechano-electrical transduction: new insights into old ideas. *J Membr Biol.* 209: 71-88.
- Robbins J. (2001) KCNQ potassium channels, physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Ther.* 90: 1-19.
- Roza C, Puel JL, Kress M, Baron A, Diochot S, Lazdunski M, Waldmann R. (2004) Knockout of the ASIC2 channel in mice does not impair cutaneous mechanosensation, visceral mechanonociception and hearing. *J Physiol.* 558: 659-669.
- Rüsch A, Kros CJ, Richardson GP. (1994) Block by amiloride and its derivatives of mechano-electrical transduction in outer hair cells of mouse cochlear cultures. *J Physiol.* 474: 75-86.
- Salinas M, Rash LD, Baron A, Lambeau G, Escoubas P, Lazdunski M. (2006) The receptor site of the spider toxin PcTx1 on the proton-gated cation channel ASIC1a. *J Physiol.* 570: 339-354.
- Shah MJ, Meis S, Munsch T, Pape HC. (2001) Modulation by extracellular pH of low- and high-voltage-activated calcium currents of rat thalamic relay neurons. *J Neurophysiol.* 85: 1051-1058.

- Shin JB, Adams D, Paukert M, Siba M, Sidi S, Levin M, Gillespie PG, Gründer S. (2005) *Xenopus* TRPN1 (NOMPC) localizes to microtubule-based cilia in epithelial cells, including inner-ear hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 12572-12577.
- Sidi S, Friedrich RW, Nicolson T. (2003) NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science*. 301: 96-99.
- Siemens J, Lillo C, Dumont RA, Reynolds A, Williams DS, Gillespie PG, Müller U. (2004) Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. *Nature*. 428: 950-955.
- Söllner C, Rauch GJ, Siemens J, Geisler R, Schuster SC, Müller U, Nicolson T; Tübingen 2000 Screen Consortium. (2004) Mutations in cadherin 23 affect tip links in zebrafish sensory hair cells. *Nature*. 428: 955-959.
- Soto E, Chávez H, Valli P, Benvenuti C, Vega R. (2001) Betahistine produces post-synaptic inhibition of the excitability of the primary afferent neurons in the vestibular endorgans. *Acta Otolaryngol Suppl*. 545: 19-24.
- Soto E, Limón A, Ortega A, Vega R. (2002) Características morfológicas y electrofisiológicas de las neuronas del ganglio vestibular en cultivo. *Gac Méd Méx*. 138: 1-14.
- Soto E, Vega R. (1988) Actions of excitatory amino acid agonists and antagonists on the primary afferents of the vestibular system of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Brain Res*. 462: 104-111.
- Soto E, Vega R, Budelli R. (2002) The receptor potential in type I and type II vestibular system hair cells: a model analysis. *Hear Res*. 165: 35-47.
- Sotomayor M, Corey DP, Schulten K. (2005) In search of the hair-cell gating spring elastic properties of ankyrin and cadherin repeats. *Structure*. 13: 669-682.
- Staruschenko A, Dorofeeva NA, Bolshakov KV, Stockand JD. (2006) Subunit-dependent cadmium and nickel inhibition of acid-sensing ion channels. *J Neurobiol*. 67: 97-107.
- Sterling P, Matthews G. (2005) Structure and function of ribbon synapses. *Trends Neurosci*. 28: 20-29.
- Stoop R, Surprenant A, North RA. (1997) Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. *J Neurophysiol*. 78: 1837-18340.
- Szallasi A, Blumberg PM. (1999) Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*. 51: 159-212.
- Tang CM, Dichter M, Morad M. (1990) Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H⁺. *Proc Natl Acad Sci*. 87: 6445-6449.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 21: 531-543.
- Tousova K, Vyklicky L, Susankova K, Benedikt J, Vlachova V. (2005) Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites. *Mol Cell Neurosci*. 30: 207-217.

- Traynelis SF, Chesler M. (2001) Proton release as a modulator of presynaptic function. *Neuron*. 32: 960-962.
- Tytgat J, Nilius B, Carmeliet E. (1990) Modulation of the T-type cardiac Ca channel by changes in proton concentration. *J Gen Physiol*. 96: 973-990.
- Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Nishigaki M, Shibata Y, Shimada S. (2002) Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J Clin Invest*. 110: 1185-1190.
- Ugawa S, Inagaki A, Yamamura H, Ueda T, Ishida Y, Kajita K, Shimizu H, Shimada S. (2006) Acid-sensing ion channel-1b in the stereocilia of mammalian cochlear hair cells. *Neuroreport*. 17: 1235-1239.
- Varming T. (1999) Proton-gated ion channels in cultured mouse cortical neurons. *Neuropharmacology*. 38: 1875-1881.
- Vega R, Mercado F, Chavez H, Limon A, Almanza A, Ortega A, Perez ME, Soto E. (2003) pH modulates the vestibular afferent discharge and its response to excitatory amino acids. *Neuroreport*. 14: 1327-1328.
- Vega R, Soto E. (2003) Opioid peptide receptors mediates an inhibitory presynaptic and excitatory postsynaptic input to the vestibular afferent neurons. *Neuroscience*. 118: 75-85.
- Voilley N, de Weille J, Mamet J, Lazdunski M. (2001) Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci*. 21: 8026-8033.
- Wahl P, Foged C, Tullin S, Thomsen C. (2001) Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist. *Mol Pharmacol*. 59: 9-15.
- Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M. (1997b) Molecular cloning of a noninactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem*. 272: 20975-20978.
- Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. (1997) A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature*. 386: 173-177.
- Waldmann R, Lazdunski M. (1998) H⁺-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol*. 8: 418-424.
- Wang WZ, Chu XP, Li MH, Seeds J, Simon RP, Xiong ZG. (2006) Modulation of acid-sensing ion channel currents, acid-induced increase of intracellular Ca²⁺, and acidosis-mediated neuronal injury by intracellular pH. *J Biol Chem*. 281: 29369-29378.
- Wang W, Duan B, Xu H, Xu L, Xu TL. (2006) Calcium-permeable acid-sensing ion channel is a molecular target of the neurotoxic metal ion lead. *J Biol Chem*. 281: 2497-2505.
- Wang W, Yu Y, Xu TL. (2007) Modulation of acid-sensing ion channels by Cu²⁺ in cultured hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience*. 145: 631-641.
- Wemmie JA, Askwith CC, Lamani E, Cassell MD, Freeman JH Jr, Welsh MJ. (2003) Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *J Neurosci*. 23: 5496-5502.

Wemmie JA, Chen J, Askwith CC, Hruska-Hageman AM, Price MP, Nolan BC, Poder PG, Lamani E, Hoshi T, Freeman JH Jr, Welsh MJ. (2002) The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron*. 34: 463-477.

Wooltorton JR, Gaboyard S, Hurley KM, Price SD, Garcia JL, Zhong M, Lysakowski A, Eatock RA. (2007) Developmental changes in two voltage-dependent sodium currents in utricular hair cells. *J Neurophysiol*. 97: 1684-1704.

Yermolaieva O, Leonard AS, Schnizler MK, Abboud FM, Welsh MJ. (2004) Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proc Natl Acad Sci*. 101: 6752-6757.

Zheng J, Dai C, Steyger PS, Kim Y, Vass Z, Ren T, Nuttall AL. (2003) Vanilloid receptors in hearing: altered cochlear sensitivity by vanilloids and expression of TRPV1 in the organ of corti. *J Neurophysiol*. 90: 444-455.

Zhong SX, Liu ZH. (2004) Immunohistochemical localization of the epithelial sodium channel in the rat inner ear. *Hear Res*. 193: 1-8.

Ziemann AE, Schnizler MK, Albert GW, Severson MA, Howard MA 3rd, Welsh MJ, Wemmie JA. (2008) Seizure termination by acidosis depends on ASIC1a. *Nat Neurosci*. 11: 816-822.

APÉNDICE

Acid-Sensing Ionic Channels in the Rat Vestibular Endorgans and Ganglia

Francisco Mercado,^{1,2} Iván A. López,³ Dora Acuna,⁴ Rosario Vega,¹ and Enrique Soto¹

¹Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla; ²Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, Mexico City, Mexico; and ³Surgery Department (Division of Head and Neck) and ⁴Mental Retardation Research Center, David Geffen School of Medicine at University of California, Los Angeles, California

Submitted 10 April 2006; accepted in final form 7 June 2006.

Mercado, Francisco, Iván A. López, Dora Acuna, Rosario Vega, and Enrique Soto. Acid-sensing ionic channels in the rat vestibular endorgans and ganglia. *J Neurophysiol* 96: 1615–1624, 2006. First published June 21, 2006; doi:10.1152/jn.00378.2006. Acid-sensing ionic channels (ASICs) are members of the epithelial Na⁺ channel/degenerin (ENaC/DEG) superfamily. ASICs are widely distributed in the central and peripheral nervous system. They have been implicated in synaptic transmission, pain perception, and the mechanoreception in peripheral tissues. Our objective was to characterize proton-gated currents mediated by ASICs and to determine their immunolocalization in the rat vestibular periphery. Voltage clamp of cultured afferent neurons from P7 to P10 rats showed a proton-gated current with rapid activation and complete desensitization, which was carried almost exclusively by sodium ions. The current response to protons (H⁺) has a p*H*_{0.5} of 6.2. This current was reversibly decreased by amiloride, gadolinium, lead, acetylsalicylic acid, and enhanced by FMRFamide and zinc, and negatively modulated by raising the extracellular calcium concentration. Functional expression of the current was correlated with smaller-capacitance neurons. Acidification of the extracellular pH generated action potentials in vestibular neurons, suggesting a functional role of ASICs in their excitability. Immunoreactivity to ASIC1a and ASIC2a subunits was found in small vestibular ganglion neurons and afferent fibers that run throughout the macula utricule and crista stroma. ASIC2b, ASIC3, and ASIC4 were expressed to a lesser degree in vestibular ganglion neurons. The ASIC1b subunit was not detected in the vestibular endorgans. No acid-pH-sensitive currents or ASIC immunoreactivity was found in hair cells. Our results indicate that proton-gated current is carried through ASICs and that ionic current activated by H⁺ contributes to shape the vestibular afferent neurons' response to its synaptic input.

INTRODUCTION

Proton-gated sodium currents were originally described in nociceptive neurons (Krishtal and Pidoplichko 1981). Acid-sensing ion channels (ASICs) are ligand-gated ion channels that are directly activated by a drop in extracellular pH (p*H*_o). Six different ASIC subunits encoded by four genes have been cloned from neuronal tissue: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, and ASIC4 (Bianchi and Drischoll 2002; Waldmann et al. 1997b; Welsh et al. 2002).

The functional role of ASICs in the peripheral nervous system was linked with nociception, perception of sour taste, modulation of synaptic transmission, and mechanosensory transduction (Lin et al. 2002; Price et al. 2000, 2001). The function of ASICs in central neurons is still elusive, although it is clear that there is an effective interaction between ASIC1a and the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor on hippocam-

pal CA1 neurons, where ASIC activity is necessary to maintain long-term potentiation (LTP) (Wemmie et al. 2002). Studies in rodent CNS have shown that ASICs are located predominantly at the postsynaptic endings (Alvarez de la Rosa et al. 2003; Wemmie et al. 2003). The ASIC1a subunit is highly permeable to Ca²⁺ (Bässler et al. 2001; Waldmann et al. 1997b; Yermolaieva et al. 2004) and its abnormal activation may constitute an important component of the pathophysiology of ischemic stroke (Xiong et al. 2004).

It has been proposed that activation of ASICs in central synapses is caused by protons that are co-liberated with glutamate (Bianchi and Drischoll 2002; Wemmie et al. 2002). Glutamatergic vesicles with p*H* ≈ 5.7 use the gradient generated by an H⁺ATPase to concentrate the neurotransmitter (Miesenböck et al. 1998; Ozkan and Ueda 1998). Glutamate release induced by high-frequency stimulation of Schaffer's collaterals in hippocampal slices produces a decrease in the p*H*_o with a duration of about 10–20 ms (Krishtal et al. 1987). At the synapse between photoreceptors and bipolar neurons in the squirrel retina, acidification of the synaptic cleft caused by paired-pulse stimulation inhibits the L-type calcium current of cone photoreceptors, producing a decrease in neurotransmitter release (DeVries 2001). These reports suggest that acidification of the synaptic cleft during neurotransmitter release has a significant role in the modulation of synaptic transmission.

To date the functional expression of ASICs in the vestibular endorgans has not been evaluated. The electrical activity of vestibular afferents of the larval tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*) has been shown to be sensitive to changes of p*H*_o (Vega et al. 2003). Data suggest that the p*H*_o action was caused in part by the modulation of the excitatory amino acid receptors on the vestibular afferent neurons (Ihle and Patneau 2000; Soto and Vega 1988; Soto et al. 1994; Tang et al. 1990; Traynelis and Cull-Candy 1990). ASIC1b and ASIC4 have been cloned and identified by RT-PCR from the rat vestibular apparatus (Bässler et al. 2001; Gründer et al. 2000). Our study characterized ASIC proton-gated currents in isolated rat vestibular afferent neurons. Immunohistochemical location of the six different ASICs subunits in the vestibular sensory periphery and ganglia was also determined.

METHODS

Animal care and procedures were in accordance with the *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and the *Reglamento de la Ley General de Salud en Materia*

Address for reprint requests and other correspondence: F. Mercado, Instituto de Fisiología-BUAP, Apartado Postal 406, Puebla, Pue. 72000, Mexico (E-mail: chimera@puebla.megared.net.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

de Investigación para la Salud of the Secretaría de Salud de México. During our work efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used (as outlined in the *Guide to the Care and Use of Laboratory Animals*, issued by the National Academy of Sciences USA).

Isolation of hair cells from the crista ampullaris

Wistar rats from postnatal days 14 to 17 were used for the electrophysiological experiments. The cristae ampullaris from the anterior and lateral semicircular canals were dissected from the temporal bones and immersed in extracellular saline solution [ESS (in mM): NaCl 140, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.2, and HEPES 10, at pH 7.4]. Hair cells were enzymatically dissociated as previously described (Almanza et al. 2003). Briefly, the cristae were maintained in a Ca²⁺- and Mg²⁺-free ESS with added 1 mg/mL porcine trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 10 min at 37°C; then tissue was kept in ESS supplemented with 0.1 mg/mL collagenase-1A for 7 min at 37°C; and finally washed in the Ca²⁺- and Mg²⁺-free ESS containing 1 mg/mL of serum bovine albumin for 10 min. The tissue was placed in the recording chamber and mechanically dissociated with fire-polished borosilicate electrodes. Hair cells were allowed to settle in the recording chamber for 10 min to promote their adhesion to the bottom of the chamber and then were continuously perfused with ESS during the course of the experiment.

Isolation and culture of vestibular afferent neurons (VANs)

Wistar rats from postnatal days 7 to 10 (before myelination takes place; Toesca 1996) were anesthetized with halothane and killed by decapitation. The head was cleaned rigorously with 70% ethanol. The inferior maxillary was removed and the cranium immersed in L-15 medium (Gibco, Grand Island, NY). The upper part of the skull and the brain were removed and under the stereoscopic microscope (Nikon, Tokyo, Japan) the otic capsule and the vestibular ganglia were identified. The vestibular ganglia were dissected and treated with a combination of 1.25 mg/mL porcine trypsin and 1.25 mg/mL collagenase-1A dissolved in L-15 culture medium for 30 min at 37°C. The ganglia were then rinsed with fresh culture medium, triturated with a fire-polished Pasteur pipette, and centrifuged at 4,000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded and this procedure was repeated three times. The isolated ganglia neurons were plated in 35-mm Nunclon petri dishes (Nunc, Roskilde, Denmark), pretreated with 100 µg/mL poly-D-lysine (Sigma-Aldrich), with 2 mL of modified L-15 medium (supplemented with 10% BFS, 500 IU penicillin, 25 µL/mL fungizone, 15.7 mM NaHCO₃, 15.8 mM HEPES, and the pH adjusted to 7.7 with NaOH. A pH of 7.7 was used to allow it to reach pH 7.4 after 30 min in a CO₂ incubator). Neurons from four vestibular ganglia were plated in each petri dish and were maintained in a 95% air-5% CO₂-humidified incubator at 37°C for 18–24 h until recording, during which time the culture dish was mounted on the stage of an inverted phase-contrast microscope (TMS, Nikon).

Electrophysiological recording

Membrane ionic currents and voltage changes in the cell membrane were studied using whole cell voltage-clamp and current-clamp techniques at room temperature (23–25°C). For cell recordings, the culture medium was replaced by ESS. Ionic currents from hair cells and VANs were recorded using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Union City, CA). Command-pulse generation and data sampling were controlled by the pClamp 9.2 software (Axon Instruments) using a 12-bit data acquisition system (Digidata 1200, Axon Instruments). Data were sampled at 5 kHz and low-pass filtered at 2 kHz.

Passive properties of the cells (cell capacitance C_m ; membrane resistance R_m ; access resistance R_a ; time constant τ) were measured

on-line with the pClamp program at -70 mV. Series resistance was electronically compensated for by 80%. All the recordings were done at a holding potential of -60 mV. For type I hair cells holding potential was set at -90 mV to avoid the activation of low-threshold K⁺ conductance (g_{KL} ; according to Chen and Eatock 2000). For current-clamp experiments, cell membrane potential was held at about -60 mV. The digital data were stored in a compatible PC computer for off-line analysis.

Patch pipettes were pulled from borosilicate-glass capillaries (TW120-3; WPI, Sarasota, FL) using a Flaming-Brown electrode puller (80/PC; Sutter Instruments, San Rafael, CA). The pipette solution contained (in mM): KCl 125, NaCl 10, CaCl₂ 0.134, HEPES 5, EGTA 10, ATPMg 2, and GTPNa 1, at pH 7.2. Once in the bath solution, the filled electrodes had a resistance between 1.5 and 3.5 MΩ.

In the time course of an experiment, seal and series resistance were continuously recorded to guarantee stable recording conditions. The recording was not included in the analysis if the access resistance changed >10%.

Analysis of proton-gated currents and drug sensitivity

To study the current activated by H⁺, ESSs with different pH values were used. In acidic ESS (pH <6.5) 10 mM 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid (MES) was used as buffer instead of HEPES. All the drugs used were dissolved in ESS at the pH being tested. The cells were constantly perfused with ESS by using a system consisting of three square perfusion tubes coupled to a step motor (SF-77B; Warner Instruments, Hamden, CT) or with a theta tube coupled to a piezoelectric device (LSS-3200; Burleigh, Ontario, Canada) for a rapid extracellular solution exchange and drug application. The perfusion system was controlled by pClamp software and had a gravity-driven flow rate of about 1 mL/s. With these conditions the surrounding cell's extracellular solution was changed in <100 ms with the step motor system and <15 ms with the piezoelectric system. The piezoelectric fast-perfusion changer was used in those experiments designed to analyze the rising time constant of proton-gated currents. This equipment allows a solution exchange sufficiently rapid to attain a full activation of ASICs (Bässler et al. 2001).

The period between applications of acidic ESS was 50 s to avoid desensitization of ASIC currents (see RESULTS). To construct the dose-response curves, duplicate applications (ESS at pH 5) before and after the pH to be tested were averaged and currents produced by the different pH values were normalized against current magnitudes at pH 5. For the study of drug actions, duplicate application at pH 6.1 before and during drug perfusion was compared. The washout of drug effects was followed. The drugs used were amiloride, acetylsalicylic acid (ASA), and FMRFamide (from Sigma-Aldrich). The effects of acidic ESS with added ZnCl₂, Pb(C₂H₃O₂)₂, GdCl₃, and high CaCl₂ were also investigated. Measurements of the current amplitude were made as the maximum value of the current (peak) less the holding current. Data were measured at the peak and at the sustained current component (4 s after peak current).

Ionic current recordings were analyzed with Clampfit 9.2 software (Axon Instruments) and Micrococcal Origin 6.0 (Micrococcal Software, Northampton, MA). Figures and statistical analysis were made using Sigma-Plot 8.0 (Systat Software, Richmond, CA). Statistical significance was evaluated with the paired or unpaired Student's *t*-test in correspondence with each case. $P < 0.05$ was considered statistically significant. All the data are presented as means \pm SE.

To evaluate the proton sensitivity of the cells and the sensitivity of the proton-gated current to amiloride, the mean of the peak current amplitude was fitted with a dose-response curve with the equation: $y = A_1 + [(A_2 - A_1)/(1 + 10^{(x-x_0)/p})]$, where A_1 and A_2 are the bottom and top asymptote, $\log x_0$ is the half-activation or inhibition between A_1 and A_2 (EC₅₀ or IC₅₀), and p is Hill's slope. The time constant of activation and desensitization of the proton-gated current

was approximated by adjusting a single, standard exponential function ($y = Ae^{-x/\tau} + C$) to the rise or decay of the current. For display, the recordings were digitally filtered at 0.5 kHz.

Immunohistochemistry

Male rats (Wistar and Sprague-Dawley, $n = 12$ each) were anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde. The temporal bones were removed from the skull, immersed in the same fixative for 6 h, and decalcified by immersion in a 5% EDTA phosphate-buffered solution for 5–7 days. The auditory bullae were further microdissected and immersed in 30% sucrose for 7 days. The inner ear was properly oriented to obtain cross sections of the semicircular crista, utricle, saccule, and vestibular ganglia. Serial sections (12 microns thick) were made by using a cryostat (Microm HM 500, Zeiss, Oberkochen, Germany). Sections were mounted on glass slides (Superfrost-plus, Fisher Scientific) and stored at -80°C until their use. Tissue sections were incubated at room temperature for 30 min with a blocking solution containing 5% normal goat serum, 5% normal horse serum, and 0.5% bovine serum albumin (fraction V, Sigma) in 0.1% Triton X100 in phosphate-buffered saline solution (PBS). Next, the solution was removed and tissue sections were exposed to the primary polyclonal antibody against either ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, or ASIC4 diluted 1:500 (all from Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX).

The source of antigens used to produce ASIC antibodies according to the manufacturer was ASIC1a: 20 amino acid peptide sequence (AAPS) near the extracellular N-terminus of rat ASIC1a; ASIC1b: 18 AAPS near the extracellular N-terminus of rat ASIC1b; ASIC2a: 20 AAPS near the extracellular N-terminus of rat ASIC2a; ASIC2b: 18 AAPS near the extracellular N-terminus of rat ASIC2b (MDEG2); ASIC3: 21 AAPS, C-terminal, cytoplasmic of rat ASIC3 (DRASIC); and ASIC4: 19 AAPS after the first transmembrane domain (extracellular) human-rat ASIC4. To further confirm the immunohistochemical results, ASIC antibodies from two additional commercial sources (Chemicon International and Alomone Laboratories) were also tested. For Alomone Labs: polyclonal antibodies against rabbit: anti-ASIC2a antibody directed to a region situated at the N-terminus of the human ASIC2a protein. ASIC2a, immunogen: DLKESPSEGLQPSSIQC corresponding to residues 2–18 of human ASIC2a protein. ASIC3: directed against a region located in the intracellular N-terminus domain. Epitope: KPRSGLEEAQAS(C) corresponding to residues 2–16 of rat ASIC3. ASIC4 antibody directed to the intracellular N-terminus domain of the rat ASIC4 protein. Epitope: corresponding to residues 7–26 of rat ASIC4. Immunogen peptide: CKIK-FAEEDAKPKKEAGDE. For Chemicon polyclonal antibodies against guinea pig: ASIC1b. Epitope: N-terminus, immunogen: synthetic peptide from rat ASIC beta residues 3–18. ASIC3. Epitope: 285–304 extracellular domain of rat ASIC3, immunogen: synthetic peptide from the extracellular domain of rat ASIC3 (C/TASLDPD-DFDPEPSDPLGSP).

Tissue sections were incubated in a humid chamber at 4°C for 48 h. After the incubation, the tissue sections were washed three times in PBS, 10 min each time. At the end of the incubation, tissue sections were postincubated with secondary antibodies against rabbit labeled with Alexa Fluor 488 (1:1,000) (Molecular Probes, Eugene, OR) for 1 h at room temperature in the dark. The tissue sections were washed with PBS then mounted with Vectashield solution (Vector Labs, Burlingame, CA).

Negative controls were made by incubating preabsorbed primary antibody with the corresponding blocking peptide (Alpha Diagnostic International) or by omitting the ASIC antibodies during the immunohistochemical procedure. Antibody absorption was made by mixing the primary antibody with the blocking peptide $1\ \mu\text{g}/1\ \mu\text{g}$. The mixture was placed at 37°C for 1 h, after which immunostaining was done as described above. Only a faint background was detected. The rat dorsal-root ganglia (DRG) were used as positive control for all

subunits, with cerebellar cortex used as positive control for ASIC2a. Figure 5 summarizes positive and negative controls.

Immunostained tissue sections were viewed and imaged in an Eclipse E800 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with RTSlider spot digital camera (Diagnostics Instruments, Sterling Heights, MI) and Image Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). All images were prepared using the Adobe Photoshop software program.

Immunoreactive cells were measured to determine their soma capacitance. Surface areas of the soma cells were assumed to be spherical and the major and minor diameters were determined and averaged to obtain a radius. The area was calculated using the equation for a sphere, $4\pi r^2$. The area was converted to capacitance using the specific capacitance value for biological membranes of $1\ \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

RESULTS

Hair cell response to pH_o shifts

Rat hair cells isolated from the crista ampullaris maintained their characteristic soma shape (flask shaped for type I hair cells and predominantly cylindrically shaped for type II) with their electrophysiological properties similar to those previously reported (Almanza et al. 2003; Chen and Eatock 2000). Perfusion of hair cells with solution with pH_o from 7.4 to 5.5 (for periods ≤ 30 s) did not affect the holding current in either type I ($n = 7$) or type II ($n = 7$) vestibular hair cells (data not shown). These results are in good agreement with immunohistochemical data indicating no expression of ASICs in hair cells (see *Immunohistochemical location of ASIC subunits*).

VANs response to pH_o shift

Vestibular afferent neurons held in primary culture express a proton-gated current with fast activation kinetics and almost complete desensitization in a 5-s pulse of acidic extracellular solution (Fig. 1A). Replacement of extracellular Na^+ for choline decreased the current to $2 \pm 0.9\%$ of the peak control current produced by pH 6.1 perfusion ($n = 9$). This indicates that the pH-sensitive current was carried mainly by Na^+ (Fig. 1A). At pH 6.1 the current has a peak density of $-56 \pm 4\ \mu\text{A}/\text{pF}$ ($n = 86$). Its dependency on the extracellular protons was estimated with a dose-response curve (Fig. 1B) with a $\text{pH}_{0.5}$ of 6.2 and a Hill number of 1.8.

The rise of the extracellular Ca^{2+} ion concentration from 1.8 to 3.6 mM produced a significant rightward shift in the dose-response pH curve, with a $\text{pH}_{0.5}$ of 6.06 and Hill number of 1.8 ($P = 0.001$ at pH 6.5 and 5.5, Student's *t*-test) (Fig. 1B). This effect is consistent with the model of ASIC gating proposed previously where Ca^{2+} is displaced from the channel pore by protons (Immke and McCleskey 2003).

The activation process of the current caused by pH 6.1 was measured by adjusting a single-power exponential function to the rising phase (10–90%) with a time constant (τ_{act}) of $33 \pm 4.7\ \text{ms}$ ($n = 17$). For the activation measurement we included only the cells (recordings) that were perfused with the theta-tube piezoelectric device. The time course of the desensitization was adjusted with a single-power exponential function and the time constant (τ_{desens}) obtained at pH 6.1 was $129 \pm 4\ \text{ms}$ ($n = 86$) (Fig. 1A). The percentage of nondesensitizing current was $6 \pm 0.7\%$ ($n = 86$). The recovery of desensitization was measured with repetitive applications of pH 6.1. Data were

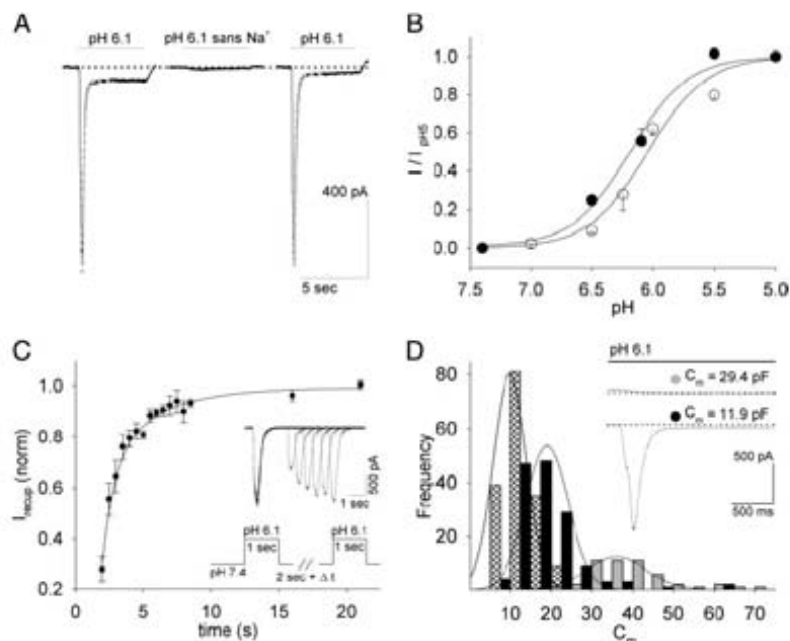


FIG. 1. Proton-gated currents in vestibular afferent neurons (VANs). *A, left*: a typical record of a proton-gated current in a VAN (holding potential = -60 mV); *middle*: in a Na^+ -free extracellular solution (replaced by choline); *right*: after wash with normal extracellular solution. Current has fast activation kinetics and an almost complete desensitization during acidic pH 6.1 use (bars above records). Gray-dotted line represents the single-power exponential fit adjusted to the falling phase of the current (desensitization: $\tau_s = 154$ ms). *B*: pH dependency of the proton-gated current. Currents recorded using an extracellular solution with 1.8 mM Ca^{2+} (filled circles) and with 3.6 mM Ca^{2+} (open circles) concentration. Curves were adjusted with a dose-response function with $\text{pH}_{0.5}$ values of 6.2 and 6.05 , both with slope of 1.8 ($r^2 > 0.98$). Each point is the mean of ≥ 4 cells. *C*: rate of the recovery of the desensitization, with the line fitting to the data representing the sum of 2 single-power exponentials ($n = 7$; $\tau_1 = 0.9$ s, $\tau_2 = 4$ s). *Inset*: representative current recording and the pH stimulation protocol that was used. *D*: frequency histogram of the capacitance related to the expression of proton-gated currents. Neurons with a mean capacitance of 18.9 ± 0.7 pF ($n = 146$; black bars) expressed proton-gated currents. In contrast, those neurons with a mean capacitance of 37 ± 1.5 pF ($n = 49$; gray bars) did not. Capacitance calculated from measurements of soma size of the immunoreactive cells to acid-sensing ionic channels (ASICs) are also shown. Lines represent the Gaussian fit to the data for the three histograms. Normality test revealed that the 3 populations were normal ($P > 0.05$, Kolmogorov-Smirnov test). *Inset*: typical responses to pH 6.1 of each group; the capacitance values are from the three specific neurons where the recordings were obtained.

fitted with a sum of two single-power exponential functions with a fast time constant (τ_f) of 0.9 ms and a slow time constant (τ_s) of 4 s (Fig. 1C) ($n = 7$). The desensitization process was partially inhibited when pH 4 was used to produce the proton-gated current. In this case the current became biphasic with a fast activating current followed by a slower one (Fig. 2). The percentage of the desensitization-resistant current (measured 4 s after the peak) at pH 4 was $42 \pm 4\%$ ($n = 3$), different from the 6% at pH 6.1 ($P \ll 0.001$, Student's *t*-test). Under our experimental conditions, proton-gated current was restricted to cells with a smaller capacitance forming two well-differentiated groups of cells, the first with a capacitance of 18.9 ± 0.7 pF ($n = 146$) and a second with 37 ± 1.5 pF ($n = 49$). This difference was statistically significant with a $P \ll 0.001$ (Student's *t*-test; Fig. 1D).

To determine the identity of proton-gated currents and to study the possible expression of some other proton-sensitive currents such as two-pore K^+ channels (TPKC: TREK, TASK, TWIK) or the transient receptor potential vanilloid-1 channel (TRPV1), the pharmacology of ASIC currents was studied using different blockers and coactivators.

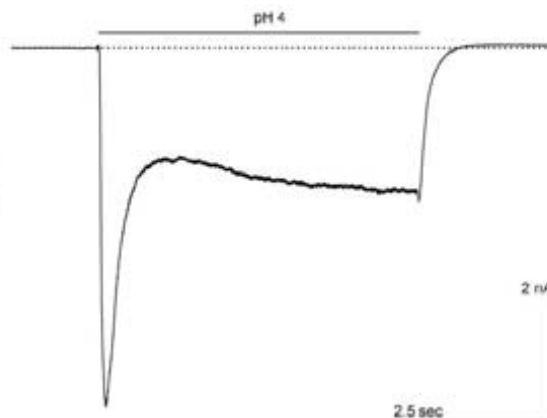


FIG. 2. Proton-gated current from a VAN at pH 4. Current showed a biphasic response to pH 4. One component with fast activation and partial desensitization is followed by a second component with slower activation that increased in amplitude during the use of the pH 4 solution.

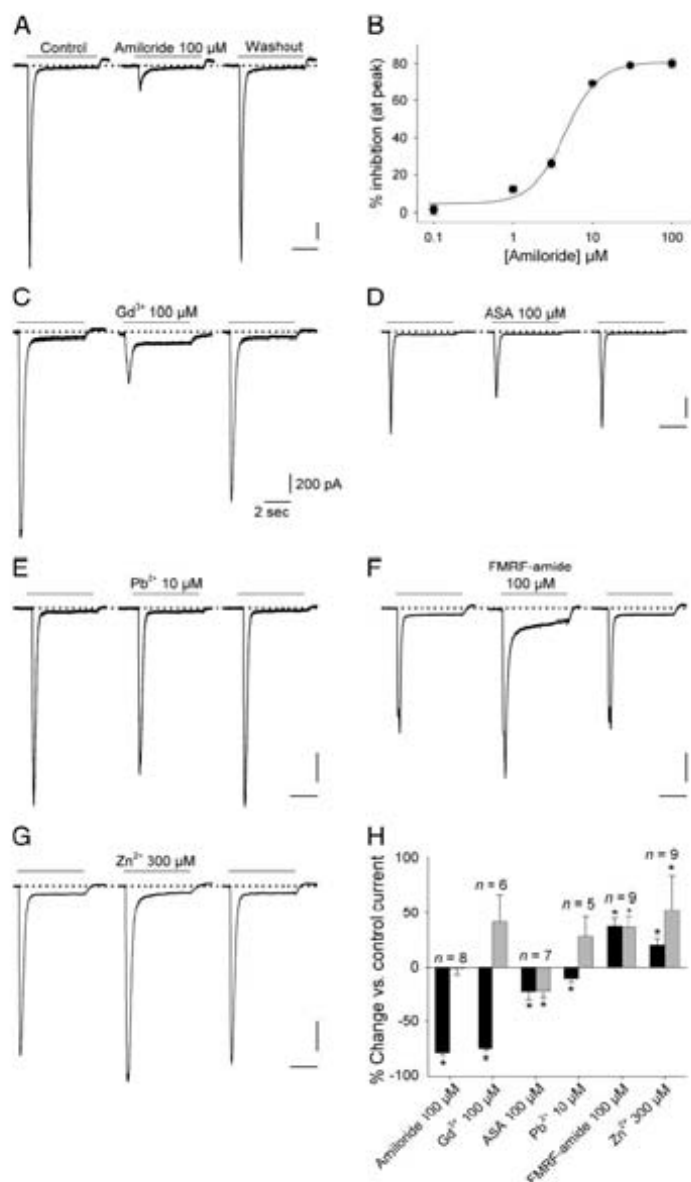


FIG. 3. Effect of the different known ASIC blockers and activators on proton-gated currents (induced by pH 6.1) in VANs. *A*: response of a VAN to the perfusion with an extracellular solution with pH 6.1 for 5 s (left trace, control), when 100 μM amiloride was copperfused with pH 6.1 (middle trace), and response during washout of amiloride (right trace). *B*: dose-response curve of the diuretic amiloride on the proton-gated current in VANs. Solid line represents the fitting with a Hill equation, where the $\text{IC}_{50} = 4.5 \mu\text{M}$. Each point is the mean of 3–8 cells. *C–E*: effect of 100 μM GdCl_3 , 100 μM acetylsalicylic acid (ASA), and 10 μM $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$. *F*: pre-application over 35 s of 100 μM FMRFamide increased the peak and the sustained component of the proton-gated current in a reversible fashion without affecting the holding current. *G*: perfusion of 300 μM ZnCl_2 increased the peak current in a significant form. Dotted lines in the recordings are the zero current. Currents were produced by 5 s of extracellular perfusion at pH 6.1. Calibration values in *C* apply to all the recordings. *H*: summary of drug effects of ASIC blockers and enhancers on proton-gated currents in VANs. Bars represent the mean \pm SE of the magnitude of the peak current (black bars) and the sustained component (gray bars) after the application of the tested drug. Data are presented as the percentage change vs. the control value. Asterisks indicate statistically significant change with respect to the control value ($P < 0.05$, paired Student's *t*-test).

The proton-gated current was blocked reversibly by the diuretic amiloride (a typical and unspecific blocker of the ENaC/DEG family; Kellenberger and Schild 2002). The use of amiloride reduced the peak current with an IC_{50} of 4.5 μM and a Hill number of 2 without affecting the sustained component. At 100 μM , amiloride blocked $80 \pm 3\%$ of the peak current and did not affect the sustained current (Fig. 3, *A* and *B*; $n = 3–8$ in each point). Also, the proton-gated current was partially blocked by copapplication of 100 μM GdCl_3 , a well-known mechanoreceptor and heteromeric ASIC blocker (Babinski et

al. 2000). This trivalent cation blocked the peak current $76 \pm 2\%$ and produced a nonsignificant increase in the sustained component of $40 \pm 25\%$ ($P = 0.17$, paired Student's *t*-test; $n = 6$; Fig. 3*C*). Other proton-sensitive currents such as TRPV1 and TPKC are not blocked by Gd^{3+} or amiloride (Tousova et al. 2005; Ugawa et al. 2002) at the concentrations used in our study.

Acetylsalicylic acid (ASA) has been shown to be an ASIC blocker with greater affinity for the ASIC3 subunit (Voilley et al. 2001). The use of 100 μM ASA in our preparation signif-

icantly reduced the peak proton-gated current $23 \pm 4\%$ ($n = 7$; $P = 0.03$, paired Student's *t*-test), and also significantly decreased the sustained component of the current $23 \pm 6\%$ (Fig. 3D) ($P = 0.017$, paired Student's *t*-test).

The blocking effect of lead acetate on ASIC1a and ASIC1b subunits at micromolar concentrations was recently described (Wang et al. 2006). To further define the participation of the ASIC1 subunits in the current caused by pH 6.1, $10 \mu\text{M}$ $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ was coapplied with the acidic solution. Lead acetate produced a significant reversible decrease of $11 \pm 4\%$ of the peak proton-gated current ($n = 5$; $P = 0.04$, paired Student's *t*-test). Furthermore, lead acetate increased the sustained current a nonsignificant $29 \pm 18\%$ (Fig. 3E) ($P = 0.2$, paired Student's *t*-test).

To determine the nature of proton-gated currents expressed in VANs, we tested the effect of FMRFamide and Zn^{2+} (two enhancers of the ASIC currents). The snail neuropeptide FMRFamide and related mammalian peptides (e.g., neuropeptide FF or SF) have been reported to inhibit ASIC desensitization acting mainly on ASIC1 and ASIC3 subunits (Askwith et al. 2000; Deval et al. 2003; Lingueglia et al. 2006; Xie et al. 2003). The use of $100 \mu\text{M}$ FMRFamide for 35 s did not cause any current nor affect the holding current, although FMRFamide significantly increased the peak proton-gated current $36 \pm 8\%$ ($P = 0.002$, paired Student's *t*-test; $n = 9$). The sustained component of the current also significantly increased from $8 \pm 2\%$ under control conditions to $36 \pm 10\%$ ($P = 0.023$, paired Student's *t*-test) (Fig. 3F).

The divalent ion Zn^{2+} , a specific ASIC2a coactivator at high μM concentrations (Baron et al. 2001; Chu et al. 2004), was used to determine whether this subunit forms part of the ASIC channels on VANs. Perfusion of VANs with $300 \mu\text{M}$ ZnCl_2 significantly increased the peak current induced by pH 6.1 with the current rising $20 \pm 6\%$ ($P = 0.04$, paired Student's *t*-test; $n = 9$). A greater effect was noticed on the sustained current with a significant increase of $52 \pm 32\%$ ($P = 0.03$, paired Student's *t*-test) (Fig. 3G).

To test whether TRPV1 channel activation was also contributing to proton-gated current, $1 \mu\text{M}$ ($n = 11$) and $10 \mu\text{M}$ ($n = 5$) capsaicin (a specific TRPV1 activator; Balaban et al. 2003; Tominaga et al. 1998) was also studied under the same conditions as those used to characterize the pH dose-response relationship. Capsaicin produced no significant effect on the holding current nor on the current caused by low pH perfusion of VAN (data not shown).

In current-clamp conditions the cultured-afferent vestibular neurons typically discharge one or two action potentials when square current injection is used (Limón et al. 2005). Perfusion of ASIC-expressing neurons with acidic solutions (pH = 6.1) caused the firing of action potentials followed by a slow depolarization. Use of $100 \mu\text{M}$ amiloride ($n = 8$) with the acidic solution prevented the generation of action potentials and reduced the slow depolarization (Fig. 4). In neurons that did not express ASIC currents, only a minor depolarization was measured when they were exposed to acidic solutions (data not shown). This depolarization was probably caused by the blocking of voltage-gated and leak- K^+ channels by protons as previously reported in DRG neurons, where leak- K^+ channels were especially sensitive to blocking by acidic pH (Baumann et al. 2004).

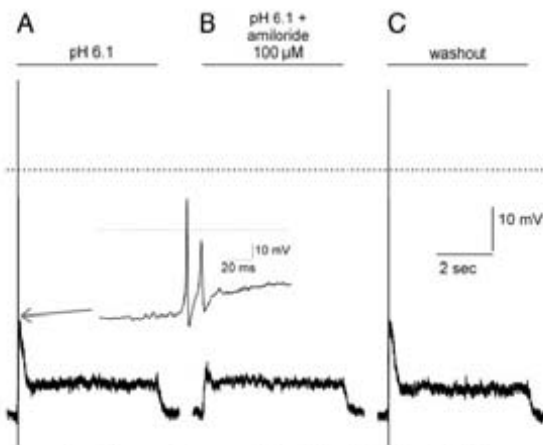


FIG. 4. Action potentials caused by acidic solutions in VANs in current clamp. *A*: perfusion of an acid solution (pH = 6.1) caused the action-potential discharge that is followed by a slow depolarization lasting for about 420 ms with a decay time constant of 375 ms. *B*: coapplication of amiloride prevented the action-potential generation and reduced the slow depolarization. *C*: removal of amiloride. Inset: time amplification of the action potentials shown in *A*. Dotted line represents 0 mV.

Immunohistochemical location of ASIC subunits

To determine the expression and location of the different ASIC subunits in vestibular endorgans, immunohistochemical experiments were done using specific antibodies against ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, and ASIC4 subunits on vestibular endorgans and ganglia sections. The control expression assays were done in DRG and cerebellar slices (Fig. 5).

Neurons in the vestibular ganglia were immunoreactive to all ASIC subunits (Fig. 6, *A* and *C–F*) except to ASIC1b (Fig. 6*B*). No immunoreactivity to any of the ASIC subunits was found at the type I or type II hair cells or supporting cells either from the crista ampullaris or the utricular macula (Fig. 6, *A1–F1* and *A2–F2*). In addition, antibodies against ASIC1a and ASIC2a subunits immunostained peripheral processes running throughout the crista ampullaris and the macula utricule (Fig. 6, *A1, C1* and *A2, C2*).

The immunoreactive neuronal cell-body diameter was measured and its soma capacitance was estimated. Measurement of stained somas in the ganglia slices showed the mean diameter was $16.7 \pm 0.3 \mu\text{m}$ with a range from 10 to $25 \mu\text{m}$ ($n = 166$). The immunoreactive cells for the different ASIC subunits have the same estimated soma size distribution (not shown). Based on this, the pooled immunoreactive cells had an estimated capacitance value of $9 \pm 3 \text{ pF}$, lower than that found experimentally ($18.9 \pm 0.7 \text{ pF}$, $n = 146$) in neurons expressing proton-gated currents (Fig. 1*D*). The origin of this discrepancy is probably caused by the estimation method used to convert area to capacitance.

DISCUSSION

By using an electrophysiological and immunohistochemical approach in VANs, we have identified a proton-gated current whose biophysical and pharmacological characteristics parallel

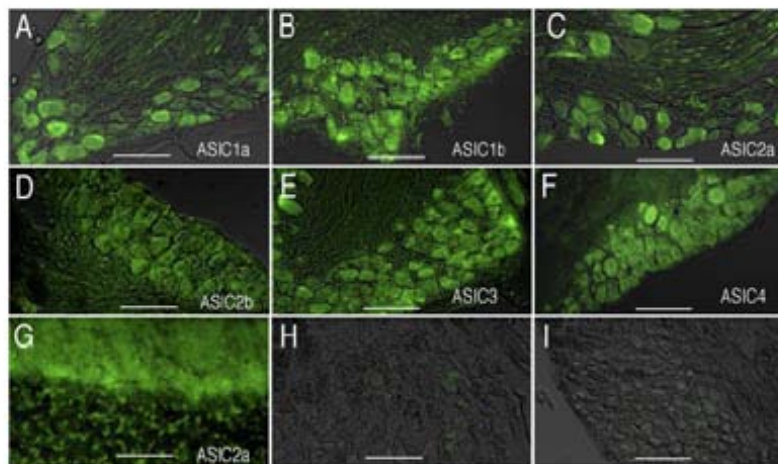


FIG. 5. Immunoreactivity of ASICs in positive and negative controls. *A–F*: ASIC immunoreactivity in the DRG: ASIC1a (*A*), ASIC1b (*B*), ASIC2a (*C*), ASIC 2b (*D*), ASIC 3 (*E*), ASIC4 (*F*). *G*: ASIC 2a immunoreactivity in the cerebellar cortex. *H*: negative control for ASIC2a in vestibular ganglia. Antibodies were preabsorbed with the corresponding peptide. *I*: negative control; no primary antibody was placed during immunohistochemistry. Magnification bars: *A–F*, 90 μ m; *G*, 70 μ m; *H* and *I*, 100 μ m.

those reported for ASIC channels. Immunoreactivity to ASIC1a, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, and ASIC4 subunits was found in vestibular ganglion neurons and ASIC1a and ASIC2a in the nerve fibers, with only the ASIC1b subunit not detected

in the vestibular ganglion neurons. In contrast, no acid-pH-sensitive currents or ASIC immunoreactivity was found in hair cells.

We found that raising the extracellular Ca^{2+} concentration produced a rightward shift in the dose–response curve to protons. Based on the competitive activity of Ca^{2+} and H^+ , it has been proposed that ASIC gating implies a displacement by protons of Ca^{2+} from the channel (Immke and McCleskey 2003). In VANs, raising the extracellular Ca^{2+} concentration from 1.8 to 3.6 mM displaced the $\text{pH}_{0.5}$ from 6.2 to 6.06.

Proton-gated currents typically had rapid activation and fast desensitization. The percentage of ASIC current resistant to desensitization was small ($\approx 6\%$) compared with the peak current that is caused at pH near the half-maximum activation. The constant rate of desensitization was similar to that produced by ASIC1a, ASIC2a, and ASIC3 heteromers, as reported in DRG neurons of the mice and rat, particularly those found in the DRG neurons of types 3 and 7 classified on the basis of a “current signature” method (Petruska et al. 2000) and in heterologous expression systems (Benson et al. 2002; Hesselager et al. 2004).

The proton-gated currents in VANs were biphasic when the neurons were stimulated at pH 4. This type of response was also observed in heterologous expression systems in which ASIC3 is expressed (Hesselager et al. 2004; Waldmann et al. 1997a), indicating that most probably the ASIC3 subunit is involved in the channel formation in VANs. Coexpression of TRPV1 may also lead to this type of biphasic current activation by pH (Tominaga et al. 1998). However, activators of TRPV1 such as capsaicin produced no effect in our experiments (Szallasi and Blumberg 1999) and Gd^{3+} blocked the pH response (Tousova et al. 2005). No TRPV1 immunoreactivity was found in VANs (not shown), indicating that ASIC3 subunit expression may be responsible for the biphasic current response. The $\text{pH}_{0.5}$ of the ASIC current in VANs was 6.2, similar to that reported for channels formed by various combinations of ASICs involving ASIC1 subunits. Combinations such as homomeric arrangements of ASIC2a (pH 4.5–4.9) or ASIC3 (6.4–6.6) have a pH dependency that is relatively far from that recorded in VANs.

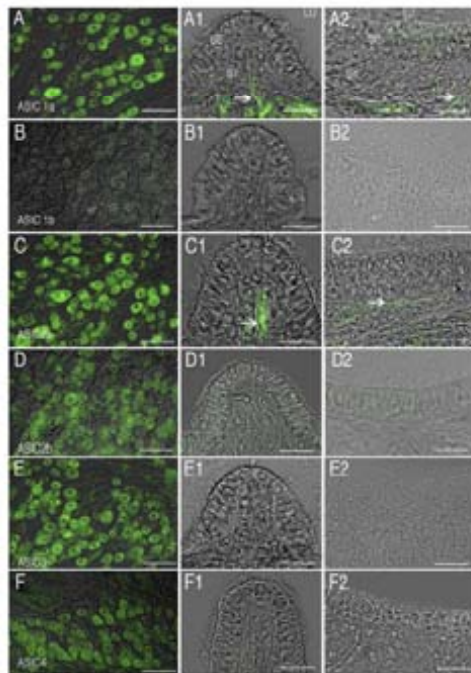


FIG. 6. Immunoreactivity of ASIC in vestibular endorgans. *A–F*: vestibular ganglia. Crista ampullaris (*A1–F1*); macula utricle (*A2–F2*); ASIC1a (*A*, *A1*, *A2*); ASIC1b (*B*, *B1*, *B2*); ASIC2a (*C*, *C1*, *C2*); ASIC 2b (*D*, *D1*, *D2*); ASIC 3 (*E*, *E1*, *E2*); ASIC4 (*F*, *F1*, *F2*). ASIC1b was the only subunit not expressed in the vestibular ganglia. In nerve fibers within the stroma (arrows in *A1*, *A2*, *C1*, *C2*) only ASIC1a and ASIC2a immunoreactivity was found. SE, sensory epithelium; ST, stroma. Magnification bars: *A–F*, 60 μ m; *A1–F1*, 30 μ m; *A2–F2*, 40 μ m.

High concentrations of Zn^{2+} enhanced the proton-gated current in VANs, suggesting the participation of ASIC2a in the formation of functional channels (Baron et al. 2001; Chu et al. 2004). Coincidentally, immunoreactivity for the ASIC2a subunit was detected. In spiral ganglion neurons of the mouse, the ASIC2a subunit was also shown to contribute to suprathreshold functions of the cochlea (Peng et al. 2004).

ASA blocked ASIC currents from VANs in a reversible fashion as it did in proton-gated currents from DRG neurons and in ASIC3 channels expressed in heterologous systems (Voilley et al. 2001). This result suggests the interesting possibility that part of the symptoms produced by ASA intoxication (such as tinnitus and vertigo) could be caused by the effect of ASA on ASIC currents. Although it was described that salicylate (the active metabolite of ASA) may act as a blocker of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) function in the cochlea (Guillon et al. 2003), recent experimental evidence suggests that NMDA receptors might not participate in the afferent synaptic transmission in this organ (Glowatzki and Fuchs 2002).

Amiloride, which is a prototypical inhibitor of the ASIC-ENaC/DEG-channel superfamily, inhibited the proton-gated currents in VANs. Amiloride has been used as a tool to differentiate between ASIC-mediated currents and other proton-gated currents such as those caused by TRPV1 or TPKK that are not significantly inhibited by amiloride (Ugawa et al. 2002).

Most significant was the action of FMRFamide, which reduced the desensitization rate of ASIC currents similarly to the effect described for ASIC1 and ASIC3 subunits expressed in heterologous systems or native ASIC currents in rodent DRG neurons (Askwith et al. 2000; Xie et al. 2003). This result reinforces the idea that proton-gated currents in VANs are primarily conducted through ASIC channels and that ASIC1 and ASIC3 subunits form part of these channels. In preliminary experiments done in the isolated vestibule of the rat, recording the multiunit electrical discharge of the semicircular canal afferent neurons, the microperfusion of 1 mM FMRFamide produced a significant increase (about 150%) in the resting discharge of the afferent neurons (A. Ortega, R. Vega, F. Mercado, and E. Soto, unpublished results). This indicates that ASIC channels are already active contributing to the resting discharge of the afferent neurons and that proton-gated currents significantly contribute to shape the discharge properties of the vestibular afferent neurons. Taken together, our electrophysiological and pharmacological results suggest that ASIC currents in VANs may be mainly produced by ASIC1a, ASIC2a, and ASIC3 subunit heteromultimers (Benson et al. 2002; Hesselager et al. 2004; Waldmann et al. 1997a,b).

Neuropeptide FF (NPFF) receptors have also been reported to mediate FMRFamide responses, although we cannot exclude that these receptors may also be expressed in afferent neurons. It has been described that the influence of these peptides can be mediated by activation of opioid receptors (Askwith et al. 2000). However, the use of FMRFamide altered the ASIC function in cultured VANs, indicating that FMRFamide affects the ASIC current independently of other possible actions.

Immunohistochemical experiments were made to elucidate the subunit composition and location of the ASICs within the vestibule. A prominent immunoreactivity of ASIC1a and ASIC2a, and also the 2b, 3, and 4 ASIC subunits, was found in

VANs (ASIC2b and ASIC4 at lower levels). Expression of various ASIC subunits (ASIC1a, 2a, 2b, 3, and 4) suggests a heteromeric arrangement of ASIC channels on the membrane of the VANs. Immunoreactivity for the ASIC1b subunit was not detected. This last result is in contrast with a report in which ASIC1b was cloned from a cDNA library specific for the vestibular system of the rat (Bässler et al. 2001). The lack of coincidence in these results cannot be explained by the use of different animal models because the ASIC expression in the vestibular endorgans, ganglia, cochlea, and the spiral ganglia has been found to be similar in rats, mice, and humans using the same experimental procedures as described here (I. Lopez, unpublished observation). The lack of immunoreactivity to ASIC1b indicates that most probably a conditional expression of this subunit could be occurring. To validate the specificity of the immunohistochemical staining, we used antibodies from three commercial sources. A similar pattern of ASIC immunoreactivity in the vestibular ganglia was found. In situ hybridization and RT-PCR studies would give a definitive answer regarding the specific population of subunits in the vestibular ganglia.

ASICs seem to be expressed in a non-uniform population of vestibular ganglion neurons with an apparent selectivity among the different neuron sizes present in the vestibular ganglia (Leonard and Kvetter 2002). The proton-gated current was recorded only from neurons of lower capacitance, suggesting that smaller-soma-diameter neurons express functional ASIC channels on the cellular membrane. Measurement of immunoreactive cell somas and calculation of their capacitance indicate that the immunoreactive cells fall close to capacitance values of the group of cells expressing a proton-gated current, showing that only small-size cells express ASIC immunoreactivity and proton-gated currents. The difference between the capacitance calculated from morphological measurement of immunoreactive cells and that measured electrophysiologically is most probably explained by the fact that for morphological capacitance calculation we assumed that cell body is a perfect sphere. Although cultured afferent neurons may have not a smooth surface, in fact lamellipodia outgrowth attaching the cell to culture surface could account for the difference in the capacitance measured experimentally from that calculated from size measurements (Limón et al. 2005; Soto et al. 2002). Studies comparing the surface area in phase-contrast microscopy with that found with electron microscopy showed that the light microscopy measurement underestimates the cell surface by $\geq 25\%$ (García-Pérez et al. 2004).

The expression of ASIC currents in the vestibular afferent neurons suggests the possibility that ASICs may constitute an important part for the normal function of the glutamatergic-afferent synaptic transmission between hair cells and afferent neurons. Synaptic activity may lead to synaptic-junction pH variations, as reported in the CNS and retinal glutamatergic synapses (DeVries 2001; Krishtal et al. 1987; Miesenböck et al. 1998; Palmer et al. 2003). The inner-ear hair cells form ribbon synapses with afferent terminals (Fuchs et al. 2003; Sterling and Matthews 2005). These kinds of synapses are specialized for a high rate of vesicle release (Sterling and Matthews 2005), constituting an endogenous source of H^+ as shown in retinal-cone bipolar cells (DeVries 2001; Hosoi et al. 2005; Palmer et al. 2003). Thus neurotransmitter release from hair cells could increase the excitability of the VANs by

activation of ASICs, providing an additional source of postsynaptic excitation. Data indicating a nonquantal sustained depolarization were previously reported in bouton- and calyx-bearing vestibular afferent neurons (Holt et al. 2006; Yamashita and Ohmori 1990). This nonquantal-like depolarization of afferent neurons has been attributed to glutamate spillover at the afferent junction (Holt et al. 2006). However, other mechanisms such as K^+ accumulation or ASIC activation cannot be discarded. Moreover, our results show that extracellular acidification caused the generation of action potentials in vestibular neurons, suggesting a functional role of ASICs in their excitability. This observation is similar to reports indicating that ASICs expressing neurons (i.e., DRG and CA1 neurons) produced action potentials when exposed to an acidic pH (Deval et al. 2003; Peng et al. 2004; Vukicevic and Kellenberger 2004; Wu et al. 2004).

Because of the action of protons on other voltage-gated currents such as the Ca^{2+} current, proton accumulation in the synaptic cleft will, at the same time, introduce a negative feedback to hair cells, decreasing presynaptic Ca^{2+} currents, as demonstrated in retinal cone receptors and in rat type I hair cells (DeVries 2001; Vega et al. 2004). Extracellular pH can also inhibit the response of glutamate receptors (Tang et al. 1990; Traynelis and Cull-Candy 1990). Consequently, the potential effect of H^+ at the synaptic level includes both pre- and postsynaptic components in a complex and state-dependent fashion.

Judging on the basis of their cell size, ASIC-expressing neurons reported here coincided with the group previously shown to lack the expression of the low-voltage-activated Ca^{2+} current [LVA (-)] (Limón et al. 2005). In this small size group of VANs, the current density of the Ca^{2+} -activated K^+ current (I_{KCa}) has been shown to be up to fourfold higher than that in larger cells. The heightened contribution of the I_{KCa} in small LVA (-) cells could determine a faster afterhyperpolarization slope, thus significantly influencing discharge regularity of VANs (Smith and Goldberg 1986). Differential expression among vestibular afferents of ASIC channels may have important functional implications in the coding of vestibular sensory information. ASIC-mediated input could contribute considerably to heighten the synaptic input to these neurons and significantly contribute to shape their discharge pattern.

Finally, ASIC channels may also significantly participate in the physiopathology of some vestibular disorders, including vestibular symptoms of lead poisoning, and would also participate in the action mechanism of amiloride in the inner ear. Furthermore, pan-ASIC knockout mice have been found to have important alterations in the maintenance of balance (Price et al. 2005), suggesting a significant role for ASICs in the function of the vestibular system.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Ellis Glazier for editing of the English-language manuscript.

GRANTS

This material is based on work supported by a grant from the University of California Institute for Mexico and the United States; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) Grant CN-04-23 to R. Vega and I. López; University of California Tobacco-Related Disease Research Program Grant 14-RT-0043 to I. López; Secretaría de Educación Pública y CONACYT Grant SEP-CONACYT 46511; and Vicerrectoría de Investigación-Benemérita

Universidad Autónoma de Puebla Grant 9G/SAL/05 to E. Soto. F. Mercado was supported by CONACYT Fellowship 185844.

REFERENCES

- Almanza A, Vega R, and Soto E. Calcium current in type I hair cells isolated from the semicircular canal crista ampullaris of the rat. *Brain Res* 994: 175–180, 2003.
- Abvarez de la Rosa D, Krueger SR, Kolar A, Shao D, Fitzsimonds RM, and Canessa CM. Distribution, subcellular localization and ontogeny of ASIC1 in the mammalian central nervous system. *J Physiol* 546: 77–87, 2003.
- Askwith CC, Cheng C, Ikuma M, Benson C, Price MP, and Welsh MJ. Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels. *Neuron* 26: 133–141, 2000.
- Babinski K, Catarci S, Blagini G, and Seguela P. Mammalian ASIC2a and ASIC3 subunits co-assemble into heteromeric proton-gated channels sensitive to Gd^{3+} . *J Biol Chem* 275: 28519–28525, 2000.
- Balaban CD, Zhou J, and Li HS. Type I vanilloid receptor expression by mammalian inner ear ganglion cells. *Hear Res* 175: 165–170, 2003.
- Baron A, Schaefer L, Lingueglia E, Champigny G, and Lazdunski M. Zn^{2+} and H^+ are coactivators of acid-sensing ion channels. *J Biol Chem* 276: 35361–35367, 2001.
- Bässler EL, Ngo-Anh TJ, Geisler HS, Ruppersberg JP, and Gründer S. Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b. *J Biol Chem* 276: 33782–33787, 2001.
- Baummann TK, Chaudhary P, and Martenson ME. Background potassium channel block and TRPV1 activation contribute to proton depolarization of sensory neurons from humans with neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 19: 1343–1351, 2004.
- Benson CJ, Xie J, Wemmle JA, Price MP, Henss JM, Welsh MJ, and Snyder PM. Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H^+ -gated channels in mouse sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2338–2343, 2002.
- Bianchi L and Driscoll M. Protons at the gate: DEG/ENaC ion channels help us feel and remember. *Neuron* 25: 337–340, 2002.
- Chen JW and Eatock RA. Major potassium conductance in type I hair cells from rat semicircular canals: characterization and modulation by nitric oxide. *J Neurophysiol* 84: 139–151, 2000.
- Chu XP, Wemmle JA, Wang WZ, Zhu XM, Saugstad JA, Price MP, Simon RP, and Xiong ZG. Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 24: 8678–8689, 2004.
- Deval E, Baron A, Lingueglia E, Mazarguil H, Zajac JM, and Lazdunski M. Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology* 44: 662–671, 2003.
- DeVries SH. Exocytosed protons feedback to suppress the Ca^{2+} current in mammalian cone photoreceptors. *Neuron* 32: 1107–1117, 2001.
- Fuchs PA, Glowatzki E, and Moser T. The afferent synapse of cochlear hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 13: 452–458, 2003.
- García-Pérez E, Vargas-Caballero M, Velázquez-Ulloa N, Minzoni A, and De-Miguel FF. Synaptic integration in electrically coupled neurons. *Biophys J* 86: 646–655, 2004.
- Glowatzki E and Fuchs PA. Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci* 5: 147–154, 2002.
- Gründer S, Geisler HS, Bässler EL, and Ruppersberg JP. A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. *Neuroreport* 11: 1607–1611, 2000.
- Guillon MJ, Caston J, Ruel J, Johnson RM, Pujol R, and Puel JL. Salicylate induces tinnitus through activation of cochlear NMDA receptors. *J Neurosci* 23: 3944–3952, 2003.
- Hesselager M, Timmermann DB, and Ahrling PK. pH Dependency and desensitization kinetics of heterologous expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits. *J Biol Chem* 279: 11006–11015, 2004.
- Holt JC, Xue JT, Brichta AM, and Goldberg JM. Transmission between type II hair cells and bouton afferents in the turtle posterior crista. *J Neurophysiol* 95: 428–452, 2006.
- Hosoi N, Arai I, and Tachibana M. Group III metabotropic glutamate receptors and exocytosed protons inhibit L-type calcium currents in cones but not in rods. *J Neurosci* 25: 4062–4072, 2005.
- Ihle EC and Patneau DK. Modulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor desensitization by extracellular protons. *Mol Pharmacol* 58: 1204–1212, 2000.
- Imanke DC and McCleskey EW. Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca^{2+} blockade. *Neuron* 37: 75–84, 2003.

Extracellular pH Modulates the Voltage-dependent Ca^{2+} Current and Low Threshold K^{+} Current in Hair Cells

Angélica Almanza · Francisco Mercado ·
Rosario Vega · Enrique Soto

Accepted: 11 December 2007
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract Extracellular protons have been shown to modulate voltage-activated ionic channels. It has been proposed that synaptic modulation by exocytosed vesicular protons would be a characteristic feature of ribbon-type synapses. Type-I hair cells have a calyceal afferent junction with a diffusionally restricted synaptic cleft. These led us to study the action of extracellular pH changes on the voltage-activated Ca^{2+} and K^{+} currents evaluated using a whole-cell patch clamp in isolated cells. The amplitude of the Ca^{2+} and the K^{+} current were reduced by extracellular acidification, but without significant changes with extracellular alkalization. A shift in the voltage dependence to a more positive membrane potential was achieved at $\text{pH} < 6.8$. Our results shows that the presynaptic K^{+} and Ca^{2+} currents are modulated by protons, indicating that protons released along with an afferent neurotransmitter would participate as a feedback mechanism in type-I hair cells.

Keywords Calcium channel · Potassium channel · ERG · KCNQ · Inner ear · Vestibular endorgans · Ribbon synapse · Synaptic · Afferent synapse · Proton · Neuromodulation · Neurotransmitter release

Introduction

Extracellular pH (pH_o) falls sharply during episodes of intense neuronal activity or with ischemia [1]. It is generally

thought that pH_o has transitory nonspecific effects because of the diffusional properties of protons and to the existence of extensive buffering mechanisms. However, recently it has been proposed that H^{+} (protons) would, under very specific circumstances, constitute signaling molecules for specific cellular processes [2, 3]. Changes in pH_o have been shown to modify synaptic transmission affecting a variety of ligand- and voltage-gated ion channels, such as glutamate receptors and Ca^{2+} channels [4–7]. The possibility of physiological extracellular acidification is derived from evidence showing that glutamate synaptic vesicles are acidified (with $\text{pH} \approx 5.7$) by an ATP-dependent proton pump [8], which in turn provides a significant source of protons in the synaptic cleft when the vesicular release occurs [9]. In the ribbon synapses between cones and bipolar cells, the synaptic vesicle release results in an acidification of the synaptic cleft that inhibits the presynaptic L-type calcium channels, then reducing transmitter release [9, 10]. This may constitute an effective negative-feedback mechanism contributing to the control of neurotransmitter release.

The inner-ear hair cells establish glutamatergic ribbon synapses with an afferent neuron, releasing a neurotransmitter tonically [11]. Vestibular type-I hair cells have a very peculiar afferent synapse that forms a narrow calyceal structure surrounding the basolateral surface of the cell [12]. This geometry causes a diffusionally restricted synaptic cleft that may have an important role in the clearance of products released from the basolateral part of the hair cell. It has been proposed that K^{+} accumulation flowing out through low-voltage-activated K^{+} conductance ($g_{\text{K}L}$) from a type-I hair cell can depolarize both hair cells and an afferent neuron [13, 14] leading to the idea that K^{+} could serve as a “cotransmitter” in this ribbon synapse [15].

The $g_{\text{K}L}$ is the greatest voltage-gated current present in type-I hair cells [16]. The $g_{\text{K}L}$ in rats, pass through the

Special issue article in honor of Dr. Ricardo Tapia-Arias.

A. Almanza · F. Mercado · R. Vega · E. Soto (✉)
Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla
(BUAP), Apartado Postal 406, Puebla 72000, Mexico
e-mail: esoto@siu.buap.mx; esoto2424@yahoo.com

KCNQ gene family potassium channels (KCNQ) and the ether-a-go-go-related-gene potassium channels (ERG), the density of either channel depends on the development stage of the animal, with the KCNQ potassium currents (< P7) predominant after birth that are gradually substituted by ERG channels at mature ages [17]. The expression of g_{KL} gives type-I hair cells their low gain. Model studies have found that because of this low gain the mechano-transducer current may be insufficient to depolarize the hair cell to significantly activate the voltage-gated calcium current [14], even though the voltage-gated calcium current activates at low voltages [18]. Processes such as the accumulation of K^+ in the synaptic cleft [13, 14] or the modulation of the g_{KL} by nitric oxide [19] have been proposed as secondary mechanisms boosting the afferent synapse. Attempts to define how g_{KL} or the voltage-gated Ca^{2+} current could be modulated (voltage activation, open probability) would contribute to define the mechanisms of neurotransmitter release in type-I hair cells [19, 20].

Previous results indicate that the vestibular endorgans have a significant sensitivity to changes of pHo, which could contribute to the posttransductional processing of sensory information [21]. Functional expression of acid-sensing ionic channels (ASICs) in the vestibular afferents of the rat suggests the possibility that pHo acidification and subsequent ASICs activation may form part of the normal function of the afferent synapse in hair cells [22]. No proton-activated currents or ASIC immunoreactivity was found in hair cells [22]. However it has been proposed that the synaptic modulation by exocytosed vesicular protons acting via inhibition of presynaptic Ca^{2+} channels would be a characteristic feature of ribbon-type synapses [10].

Because of the possibility that protons released together with glutamate may modulate the afferent synaptic transmission in type-I hair cells, in our work we examined the action of pHo changes on the voltage-activated Ca^{2+} current and the g_{KL} expressed in vestibular type-I hair cells, and further their probable implications for synaptic transmission are discussed. Some of these results were previously presented in abstract form [23].

Experimental Procedure

The experiments were made in young Long-Evans rats (postnatal days 14–18) supplied by the “Claude Bernard” animal house of the Autonomous University of Puebla. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used, as outlined in the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” issued by the National Academy of Science, USA.

Hair Cell Dissociation

Hair cells were enzymatically dissociated from the semi-circular canal crista ampullaris of the rat as reported previously [24]. In brief, tissue pieces containing the vestibular sensory epithelia were incubated in normal Tyrode solution (Table 1) containing 0.2 mg/ml IA type collagenase for 7 min at 35°C, followed by cell incubation for 10 min at 35°C in a Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free Tyrode solution (Table 1) with 1 mg/ml porcine trypsin. Tissue was finally washed for 10 min at 4°C in a Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free Tyrode solution containing 1 mg/ml bovine serum albumin. All enzymes were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The tissue was then placed in the recording chamber on an inverted microscope stage (Nikon Diaphot, Tokyo, Japan) and cells were isolated by gently triturating the tissue with fire-polished Pasteur pipettes. Cells settled and adhered to the bottom of the recording chamber within 10 min. The recording chamber was continuously perfused with an extracellular solution designed either for the recording of the K^+ or the Ca^{2+} currents (Table 1) at a constant rate (0.5 ml/min) using a peristaltic pump (Microperpex, LKB, Sweden).

Isolated cells were visualized with phase-contrast optics. Type-I hair cells were identified using morphological criteria [19, 24, 25]. Cells that exhibited a flask-shaped body with a highly refringent cuticular plate wider than the hair cell neck were considered to be type-I hair cells.

Table 1 Solutions (in mM)

	KCl	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂	BaCl ₂	TEACl	CsCl	NMDG ⁺	HEPES	EGTA	GTPNa	ATPMg	Glucose
Tyrode	5.4	140	1.2	1.8	–	–	–	–	10	–	–	–	10
Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free Tyrode	5.4	140	–	–	–	–	–	–	10	1	–	–	10
K^+ -low intracellular	30	10	–	0.134	–	–	–	125	5	10	1	2	–
Extracellular Ba^{2+}	–	55	–	0.1	20	23	30	–	10	–	–	–	10
Intracellular Cs^+ -TEA	–	–	–	0.1	–	23	75	80	10	10	1	2	–

Osmolarity adjusted to ~300 mOsm

Extracellular solutions adjusted to pH 7.4

Intracellular solutions adjusted to pH 7.2

Voltage Clamp Recording

Whole-cell recordings were done with the patch-clamp technique in the whole-cell configuration at room temperature (20–22°C). The patch pipettes had a resistance of 3–5 M Ω when filled with the intracellular solution (Table 1). Recordings were made with an axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Union City, CA). Command-pulse generation and data sampling (every 200 μ s) were controlled by pClamp 8.0 software (Molecular Devices) using a 12-bit AD-DA converter (Digidata 1200, Molecular Devices). The membrane capacitance and series resistance (80%) were electronically compensated. Voltages were corrected for a 6.8 mV liquid junction potential for the Ba²⁺ extracellular solution and Cs⁺ and TEA intracellular Ca²⁺ solutions (Table 1). Recordings were analyzed off-line with pClamp 8.0, SigmaPlot 8.0 (Systat Software Inc., Richmond, CA) and Origin 6.0 software (Microcal Software, Northampton, MA).

For assessment of the effect of pH_o on Ca²⁺ and K⁺ currents, extracellular solutions with different pH values were used. In acidic solutions below pH 6.5 10 mM 2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid (MES) was used as buffer instead HEPES. Solutions were adjusted to different pHs with NaOH or HCl.

Ca²⁺ Current Recording

To study the Ca²⁺ current 300 ms depolarizing test pulses to -10 mV from a holding potential of -60 mV every 4 s were used. To construct the current-voltage relationships (*I-V*), the Ca²⁺ currents were caused by 200 ms voltage steps between -100 and 50 mV from a holding potential of -60 mV with 10 mV increments every 2 s before and after changing the bath solution from pH_o 7.4 to a test pH_o and back to pH_o 7.4. In each condition, the Ca²⁺-current amplitude was measured between 155 and 175 ms after the start of voltage steps. The current produced between -100 and -70 mV was fitted with a linear function that was subtracted assuming a linear leak throughout the whole *I-V* relationship [26]. Activation curves were obtained by adjusting to the normalized conductance a single Boltzmann function $f(V) = 1/(1 + \exp[(V_{1/2} - V_m)/s])$, where V_m is the membrane potential, $V_{1/2}$ is the half-maximum activation voltage, and s is the slope factor.

K⁺ Current Recording

For recording the K⁺ current, type-I hair cells were maintained in Tyrode solution (Table 1). The pipette was filled with a low-potassium intracellular solution (Table 1) to

reduce the amplitude of g_{K1} and to minimize voltage-clamp errors caused by an uncompensated series resistance. This error was calculated and corrected off-line. In this experimental condition the K⁺ equilibrium potential (estimated by Nernst equation) was -43 mV. No ionic current was blocked because in type-I hair cells the total current is highly dominated by g_{K1} (see "Results") [16, 17]. Hair cells were stimulated with 80 ms square-voltage pulses from -110 to 40 mV with 10 mV increments and from a holding potential of -100 mV to construct the *I-V* relationship. To test the effect of the acidic pH_o, 400 ms square pulses from -100 to 40 mV were used. The activation-voltage dependence before and during the use of acidic pH was estimated by adjusting a single Boltzmann function to the normalized conductance.

Statistics

Numerical data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical differences were determined using a Student's *t*-test. A $P < 0.05$ was used to denote statistical difference between the groups.

Results

pH_o Action on the Ca²⁺ Current

At pH 7.4 the Ca²⁺ current in type-I hair cells activated rapidly and had no significant inactivation during the 200 ms test pulse (Fig. 1a). The *I-V* relationship shows that the current activated at approximately -60 mV has a maximum peak at -18 mV and a reverse potential above 40 mV (Fig. 1b). The normalized conductance was fitted with a Boltzmann function with $V_{1/2} = -36.6 \pm 0.8$ mV and $s = 5.6 \pm 0.1$ mV ($n = 16$). These characteristics are in agreement with previous results in the rat and chick, which indicated that the Ca²⁺ current in type-I hair cells is a L-type Ca²⁺ current [24, 27, 28]. Previously we showed that CdCl₂ and nimodipine produce a concentration-dependent reduction of the Ca²⁺ current in type-I hair cells while a L-type Ca²⁺ channel activator (S)-(-)-Bay K8644 increases the inward current [24]. Extracellular acidification produced a pH-dependent decrease of the Ca²⁺ current (Fig. 1a, b). Acidification to pH_o 6.8 significantly reduced the peak current amplitude by $23 \pm 6\%$ ($P = 0.03$; $n = 4$) without significant effect on the Ca²⁺-current activation or inactivation rates (Fig. 1a). Further acidification to pH_o 6 (Fig. 1b) and pH_o 5 diminished the Ca²⁺ current by $52 \pm 3\%$ ($P < 0.001$; $n = 5$) and $75 \pm 6\%$ ($P = 0.006$; $n = 3$). Extracellular alkalization to pH_o 8 did not significantly affect the Ca²⁺ current amplitude ($P = 0.4$, $n = 3$; Fig. 1c, d) nor its time course.

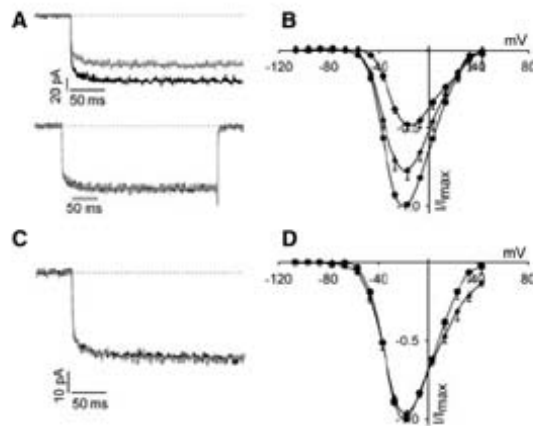


Fig. 1 Acidification but not alkalization of the extracellular solution modulates the Ca^{2+} current. (a) Sample traces of Ca^{2+} currents recorded at pHo 7.4 (black trace) and during exposure of the cell to an acidic extracellular solution (pHo 6.8; gray trace). Lower trace, the current after pHo 6.8 was scaled (multiplied by 1.32 factor) to show that a nonsignificant effect on the Ca^{2+} -current kinetics is produced by acid pHo. (b) I - V relationship for the Ca^{2+} current obtained before (\bullet) and during application of solutions with pHo 6.8 (\blacktriangle) and 6 (\blacklozenge). Data points are expressed as a percent of the maximum current at pHo 7.4. (c) Sample traces of Ca^{2+} currents recorded in a solution with pHo 7.4 (black trace) and during exposure of the cell to alkaline solution (pHo 8; gray trace). (d) The I - V relationship for Ca^{2+} current recorded before (\bullet) and during application of alkaline solution (\blacktriangle ; pH 8). Alkalinization had a nonsignificant effect on the Ca^{2+} current

The Boltzmann fit to the Ca^{2+} -channel conductance was done to determine the effect of pHo changes on the voltage dependence of channel activation. Acidification to pH 6.8 (Fig. 2a) and alkalization to pH 8 (Fig. 2b) did not significantly change the $V_{1/2}$ or the s . Further acidification to pH 6 and pH 5 reversibly shifted the $V_{1/2}$ of the conductance to positive potentials by 7.4 ± 2.4 mV ($n = 5$; $P = 0.03$) and 10.2 ± 2.6 mV ($n = 3$; $P = 0.05$) (Fig. 2a, c). No significant changes in the slope factor were observed. A pH-current plot was constructed by fitting normalized current amplitudes ($I/I_{7.4}$) as a function of the pHo, from which an apparent pKa of 6.7 and slope of 0.6 were estimated (Fig. 2d).

pHo Action on the K^+ Current

The total current in type-I hair cells activates at voltages above -90 mV. The current showed slow activation, partial inactivation, and very slow deactivation kinetics (Fig. 3a, c). These properties are in agreement with the previous observation that the total current from type-I hair cells is dominated by g_{KL} which has been thoroughly studied from the pharmacological and biophysical viewpoints [17, 19]. At pHo 7.4 the half-voltage activation was

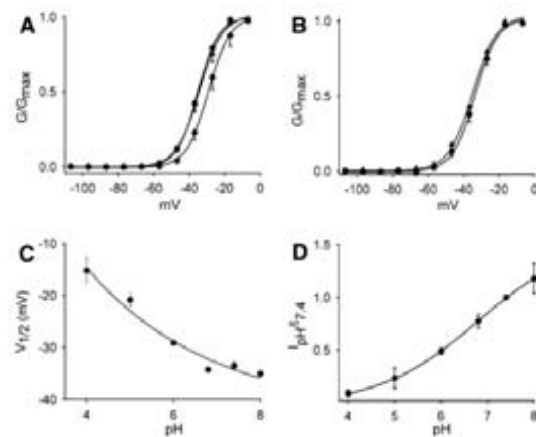


Fig. 2 Modulation of the Ca^{2+} conductance by extracellular pH. (a) Acidification to pHo 6 (\blacklozenge) shifts the $V_{1/2}$ to positive membrane potentials whereas acidification to pHo 6.8 (\blacktriangle) did not modify the Ca^{2+} -current activation. Continuous lines show the Boltzmann fit to data points. (b) Application of an alkaline extracellular solution did not affect the Ca^{2+} -current activation. (c) Extracellular solutions with pH around pHo 7.4 did not modify the $V_{1/2}$ of the Ca^{2+} current. Further acidification results in a depolarizing shift in the half maximum activation voltage of the Ca^{2+} -current activation. A monoexponential function was well adjusted to data points (solid line). (d) The Ca^{2+} current normalized with respect to current at pH 7.4 ($I/I_{7.4}$). Fitting of the data points with a Hill equation (continuous line) revealed an apparent pKa = 6.7

obtained by adjusting a single Boltzmann function to the normalized conductance. The $V_{1/2}$ obtained was -78 ± 4 mV and the s was 6.4 ± 2.5 mV ($n = 7$). When pHo 6.1 was used, the current amplitude was reduced from 1.3 ± 0.3 nA measured at -30 mV under control conditions to 0.8 ± 0.06 nA after the exposure to acidic pHo ($n = 4$; $P < 0.05$; Fig. 3a) and the $V_{1/2}$ significantly changed to -63.3 ± 3.7 mV and the s was 4 ± 0.9 mV ($P < 0.05$; $n = 4$; Fig. 3b). The deactivation kinetics of the current were significantly accelerated by acidic pH. The deactivation rate was fitted using two time-constants (fast τ_f and slow τ_s time-constants, consistent with the idea of more than one channel family constituting the current) under control conditions. They were $\tau_s = 158 \pm 47$ ms and $\tau_f = 15 \pm 2$ ms and after pHo 6.1 they changed to $\tau_s = 77 \pm 9$ ms and $\tau_f = 8 \pm 0.5$ ms ($P < 0.05$ for the τ_s ; $n = 5$; Fig. 3c). The use of solutions of pHo = 8 did not produce significant changes in the total current amplitude nor in its voltage dependence (data not shown, $n = 3$).

Discussion

Our results show that modifications in pHo modulate the voltage-activated Ca^{2+} and the K^+ currents in mammalian

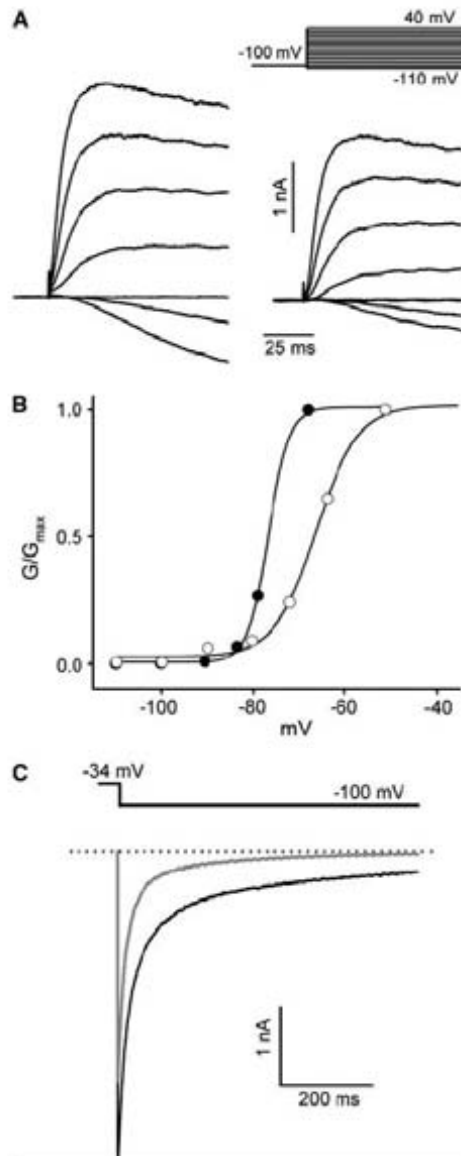


Fig. 3 Acidification of extracellular solution inhibits g_{KL} . (a) Ionic currents produced with voltage pulses according to the recording protocol shown in the upper part. Under control conditions (left) and after application of pH 6.1. For a step potential below -50 mV the g_{KL} showed an inward component caused by the equilibrium potential of K^+ in our recording solutions, which is -43 mV. (b) Normalized conductance from the cell shown in a with a $V_{1/2}$ of -77 mV under control conditions and -66 mV during pH 6.1 perfusion. Both values were estimated by fitting the data with a Boltzmann function. (c) The tail current recorded at -100 mV after a voltage step to -34 mV. Deactivation kinetics were significantly enhanced by acid pH (gray trace). Both slow and fast time-constants were reduced with the perfusion of pH 6.1, from $\tau_f = 24$ ms and $\tau_s = 180$ ms to $\tau_f = 18$ ms and $\tau_s = 150$ ms

vestibular type-I hair cells. This modulation may play a significant role in the neurotransmission between hair cells and afferent neurons.

Ca²⁺ Currents

Normalized current amplitudes ($I/I_{7.4}$) fitted as a function of extracellular pH revealed an apparent pKa of 6.7, which coincides with the apparent pKa reported for high-voltage-activated Ca²⁺ currents in thalamic-relay neurons of the rat (pKa = 6.5) [29] and in human-arterial mesenteric cells (pKa = 6.8) [30].

Extracellular acidification below pH 6.8 inhibited the Ca²⁺ current shifting the half-activation voltage in the positive direction of the membrane potential, though acidification to pH 6.8 reduced the Ca²⁺-current amplitude without changes in the half-activation voltage. These changes may result from the participation of two mechanisms; (1) the alterations in surface potential, caused by an interaction of protons with fixed negative charges facing the surface of the cell membrane, will cause a shift in the activation and inactivation process of the channel when a lower pH was used [31, 32], and (2) a direct action of H⁺ on negative groups within the channel modifying the Ca²⁺-channel conductance state, which has been shown to occur at pH ≈ 7 [33–35]. The pH changes around pH 7 are insufficient to cause a significant modification of the surface potential (screen effect) but are enough to block the movement of Ca²⁺ through the channel. Below pH 6.8 both mechanisms could be participating by blocking the Ca²⁺ current and shifting the membrane potential influencing the voltage sensor of the channel.

Although alkalization has been shown to produce from a 6 to 27% increase in Ca²⁺ current in the ventral-horn motoneurons of the mouse and the hippocampal-CA1 neurons of the rat [36, 37], increasing the pH produced nonsignificant changes in the Ca²⁺ current in our experiments. The lower sensitivity to pH variations in our preparation may be caused by the high extracellular Ba²⁺ concentration used [38]. Also, vestibular hair cells express L-type voltage-activated Ca²⁺ channels formed by the α_{1D} subunit [24, 27]. Modifications in the Ca²⁺ currents caused by variations in the pH were more pronounced in T-type Ca²⁺ channels than in L-type Ca²⁺ channels [29, 33]. Moreover, variations in the pH modulate the calcium channels expressed in cones (that express the α_{1D} subunit) but not in rods (that express the α_{1F} subunit) of the retina [39].

K⁺ Currents

The g_{KL} under control conditions (at pH 7.4) had slow activation, slight inactivation, and very slow deactivation

kinetics during short voltage pulses. These properties are in agreement with previous results obtained in rat type-I hair cells and heterologously expressed native KCNQ and ERG channels [17, 40–42]. Acidic pH_o use (pH 6.1) reduced the amplitude of the g_{K1} , displaced its voltage dependency to positive values, and enhanced its deactivation kinetics. In KCNQ 2/3 heteromer channels acidic pH_o reduces the open probability and favors a low conductance state [41]. The reduction of the open probability was related to a direct pore block by protons. For KCNQ1 and KCNQ 2/3 a modification in the gating process in acidic extracellular solution was observed, suggesting that part of the effects reported were caused by a slowing of activation and deactivation kinetics [41, 42].

For the ERG channels the observations related to the effect of the exposure of acidic pH were similar to those reported for KCNQ channels except that a decrease in the deactivation time-constant was found when acidic pH_o was used [40, 43]. This coincides with our results where with pH 6.1 the deactivation kinetics rose (thus producing a decrease of the time-constant), suggesting that an ERG-like current was mainly recorded from type-I hair cells in our experiments. This result is consistent with reports indicating that the predominant current underneath the g_{K1} at P14–P18 is an ERG-channel current [17]. Though an increase in ERG and KCNQ currents were reported when an alkaline pH was used [41, 43], in type-I hair cells there was no significant increase at pH 8. The reason could come from the pH_o used in our experiments because in other studies the pH_o used was > 8.4 [41, 43].

Conclusion

Our study shows that the presynaptic K^+ and Ca^{2+} currents are modulated by H^+ , and preliminary model data indicate that neurotransmitter release in calyceal type-I hair cells may produce a significant pH_o change in the synaptic cleft. The inhibition of the calcium current would reduce the neurotransmitter release whereas the reduction of g_{K1} would increase the gain of the hair cell. Furthermore, at a postsynaptic level it was shown that extracellular acidification reduces the excitatory input blocking NMDA and AMPA receptors [21]. The final effect of acidification of the synaptic cleft in the hair cell-afferent neuron synapse would represent a complex balance between the magnitude of excitatory and inhibitory effects and of the timing of these actions. Besides other neurotransmitters and neuromodulators acting in this synapse, our work shows that proton concentration would act as a feedback mechanism that modulates the hair cell-afferent neuron synapse.

Acknowledgements The authors wish to thank Dr. Ellis Glazier for the editing of the English-language manuscript. This material is based on work supported by grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT 46511) and VIEP-BUAP (9/G/SAL/05 and 20/SAL/06-G). FM was a CONACyT fellowship 185844.

References

- Chesler M (2003) Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev* 83:1183–1221
- Brändén M, Sandén T, Brzezinski P et al. (2006) Localized proton microcircuits at the biological membrane-water interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19766–19770
- Garza A (2007) Master in Sciences Thesis, Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla, México
- Prod'hom B, Pietrobon D, Hess P (1987) Direct measurement of proton transfer rates to a group controlling the dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channel. *Nature* 329:243–246
- Krafte DS, Kass RS (1988) Hydrogen ion modulation of Ca channel current in cardiac ventricular cells. Evidence for multiple mechanisms. *J Gen Physiol* 91:641–657
- Traynelis SF (1996) pH modulation of ligand-gated ion channels. In: Kaila K, Ransom BR (eds) pH and brain function. John Wiley and Sons, New York
- Ihle EC, Patneau DK (2000) Modulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor desensitization by extracellular protons. *Mol Pharmacol* 58:1204–1212
- Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394:192–195
- DeVries SH (2001) Exocytosed protons feedback to suppress the Ca^{2+} current in mammalian cone photoreceptors. *Neuron* 32:1107–1117
- Palmer MJ, Hull C, Vigh J, von Gersdorff H (2003) Synaptic cleft acidification and modulation of short-term depression by exocytosed protons in retinal bipolar cells. *J Neurosci* 23:11332–11341
- Fuchs PA, Glowatzki E, Moser T (2003) The afferent synapse of cochlear hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 13:452–458
- Guth PS, Perin P, Norris CH et al (1998) The vestibular hair cells: post-transductional signal processing. *Prog Neurobiol* 54:193–247
- Goldberg JM (1996) Theoretical analysis of intercellular communication between the vestibular type I hair cell and its calyx ending. *J Neurophysiol* 76:1942–1957
- Soto E, Vega R, Budelli R (2002) The receptor potential in type I and type II vestibular system hair cells: a model analysis. *Hear Res* 165:35–47
- Kharkovets T, Hardelin JP, Sahebdine S et al (2000) KCNQ4, a K^+ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4333–4338
- Rüsch A, Eatock RA (1996) A delayed rectifier conductance in type I hair cells of the mouse utricle. *J Neurophysiol* 76:995–1004
- Hurley KM, Gaboyard S, Zhong M et al (2006) M-like K^+ currents in type I hair cells and calyx afferent endings of the developing rat utricle. *J Neurosci* 26:10253–10269
- Zampini V, Valli P, Zucca G et al (2006) Single-channel L-type Ca^{2+} currents in chicken embryo semicircular canal type I and type II hair cells. *J Neurophysiol* 96:602–612
- Chen JW, Eatock RA (2000) Major potassium conductance in type I hair cells from rat semicircular canals: characterization and modulation by nitric oxide. *J Neurophysiol* 84:139–151

20. Almanza A, Navarrete F, Vega R et al (2007) Modulation of voltage-gated Ca^{2+} current in vestibular hair cells by nitric oxide. *J Neurophysiol* 97:1188–1195
21. Vega R, Mercado F, Chavez H et al (2003) pH modulates the vestibular afferent discharge and its response to excitatory amino acids. *Neuroreport* 14:1327–1328
22. Mercado F, Lopez IA, Acuna D et al (2006) Acid-sensing ionic channels in the rat vestibular endorgans and ganglia. *J Neurophysiol* 96:1615–1624
23. Vega R, Almanza A, Mercado F et al (2004) Modulation by extracellular pH of voltage activated calcium current of type I rat vestibular hair cells. *J Vestib Res* 14:187–190
24. Almanza A, Vega R, Soto E (2003) Calcium current in type I hair cells isolated from the semicircular canal crista ampullaris of the rat. *Brain Res* 994:175–180
25. Rüsçh A, Lysakowski A, Eatock RA (1998) Postnatal development of type I and type II hair cells in the mouse utricle: acquisition of voltage-gated conductances and differentiated morphology. *J Neurosci* 18:7487–7501
26. Martinez-Dunst C, Michaels RL, Fuchs PA (1997) Release sites and calcium channels in hair cells of the chick's cochlea. *J Neurosci* 17:9133–9144
27. Bao H, Wong WH, Goldberg JM et al (2003) Voltage-gated calcium channel currents in type I and type II hair cells isolated from the rat crista. *J Neurophysiol* 90:155–164
28. Masetto S, Zampini V, Zucca G et al (2005) Ca^{2+} currents and voltage responses in type I and type II hair cells of the chick embryo semicircular canal. *Pflugers Arch* 451:395–408
29. Shah MJ, Meis S, Munsch T et al (2001) Modulation by extracellular pH of low- and high-voltage-activated calcium currents of rat thalamic relay neurons. *J Neurophysiol* 85:1051–1058
30. Smirnov SV, Knock GA, Belevych AE et al (2000) Mechanism of effect of extracellular pH on L-type Ca^{2+} channel currents in human mesenteric arterial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H176–H185
31. Ohmori H, Yoshii M (1977) Surface potential reflected in both gating and permeation mechanisms of sodium and calcium channels of the tunicate egg cell membrane. *J Physiol* 267:429–463
32. Iijima T, Ciani S, Hagiwara S (1986) Effects of the external pH on Ca channels: experimental studies and theoretical considerations using a two-site, two-ion model. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:654–658
33. Tytgat J, Nilius B, Carmeliet E (1990) Modulation of the T-type cardiac Ca channel by changes in proton concentration. *J Gen Physiol* 96:973–990
34. Talavera K, Janssens A, Klugbauer N et al (2003) Extracellular Ca^{2+} modulates the effects of protons on gating and conduction properties of the T-type Ca^{2+} channel $\alpha_1\text{G}$ ($\text{Ca}_v3.1$). *J Gen Physiol* 121:511–528
35. Klöckner U, Mikala G, Schwartz A et al (1996) Molecular studies of the asymmetric pore structure of the human cardiac voltage-dependent Ca^{2+} channel. Conserved residue, Glu-1086, regulates proton-dependent ion permeation. *J Biol Chem* 271:22293–22296
36. Carlin KP (2005) Modulation of calcium currents in mouse ventral horn neurons by extracellular pH. *Eur J Neurosci* 22:2655–2660
37. Tombaugh GC, Somjen GG (1996) Effects of extracellular pH on voltage-gated Na^+ , K^+ and Ca^{2+} currents in isolated rat CA1 neurons. *J Physiol* 493:719–732
38. Klöckner U, Isenberg G (1994) Calcium channel current of vascular smooth muscle cells: extracellular protons modulate gating and single channel conductance. *J Gen Physiol* 103:665–678
39. Hosoi N, Arai I, Tachibana M (2005) Group III metabotropic glutamate receptors and exocytosed protons inhibit L-type calcium currents in cones but not in rods. *J Neurosci* 25:4062–4072
40. Anumonwo JM, Horta J, Delmar M et al (1999) Proton and zinc effects on HERG currents. *Biophys J* 77:282–298
41. Prole DL, Lima PA, Marrion NV (2003) Mechanisms underlying modulation of neuronal KCNQ2/KCNQ3 potassium channels by extracellular protons. *J Gen Physiol* 122:775–793
42. Peretz A, Schottlndreier H, Aharon-Shamgar LB et al (2002) Modulation of homomeric and heteromeric KCNQ1 channels by external acidification. *J Physiol* 545(Pt 3):751–766
43. Jiang M, Dun W, Tseng GN (1999) Mechanism for the effects of extracellular acidification on HERG-channel function. *Am J Physiol* 277(4 Pt 2):H1283–H1292

Canales iónicos sensibles a la concentración extracelular de protones: estructura, función, farmacología y fisiopatología

F. Mercado ^{a,b}, R. Vega ^a, E. Soto ^a

ION CHANNELS THAT ARE SENSITIVE TO THE EXTRACELLULAR CONCENTRATION OF PROTONS: THEIR STRUCTURE, FUNCTION, PHARMACOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

Summary. Aim. Acid sensing ion channels (ASIC) members of the ENaC degenerine channel family, have been shown to participate in various sensorial pathways including nociception, also they have been shown to participate in synaptic transmission, learning and memory processes and in the pathophysiology of the ischemic stroke. Development. The proton concentration in the organism is strictly regulated by distinct buffer systems. Drastic changes of pH are generated only by pathological conditions as is the ischemia; however, some physiological processes may produce local changes in the extracellular pH. Recently, a new family of proton receptors known as ASIC has been cloned. These are ionic channels inactivated at physiological pH (7.4) and activated with a pH fall (increase in H⁺ concentration). ASICs are permeable to sodium ions and in a lesser degree to calcium ions, activation of these channels leads to an increase in cell excitability. The ASICs are distributed widely in the central and peripheral nervous system, and in specialized epithelia. In the past few years they have become a focus of interest due to its role in nociception, taste perception, long term potentiation and the pathophysiology of ischemic stroke. Conclusions. In this review we address the most relevant molecular, physiological and pharmacological aspects of the ASICs, its participation in some pathological process, and the perspectives of basic and clinic investigation in this arising research field. [REV NEUROL 2005; 41: 667-75]

Key words. ASIC. Mechanotransduction. Neuromodulation. Nociception. Physiology.

INTRODUCCIÓN: pH EXTRACELULAR

El pH es una variable fisiológica controlada de manera muy precisa en el organismo. La homeostasis del pH se lleva a cabo a través de la excreción renal, la respiración y por los sistemas amortiguadores. Estos últimos son la principal herramienta del control del pH en el sistema nervioso, donde el ión de bicarbonato es abundante en el espacio extracelular (en concentración de 26 mM) [1]. Se han documentado variaciones significativas de pH exclusivamente bajo condiciones patológicas, como la isquemia [2]. Sin embargo, se ha acumulado información en una serie de comunicaciones de la bibliografía los cuales sugieren que cambios en el pH extracelular pueden ocurrir de manera local (en, por ejemplo, los espacios intersinápticos) en condiciones fisiológicas en el sistema nervioso [3-5].

El pH extracelular modula la función de distintos tipos de receptores ionotrópicos neuronales como los purinérgicos [6], los colinérgicos [7], los gabérgicos (particularmente los receptores del tipo GABA_A) [8] y los glutamatérgicos, tanto del tipo ácido α -amino-isoxazol-propiónico (AMPA) [9] y ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) [10,11], todos ellos imprescindibles en la transmisión sináptica. Además, se ha observado que los cambios de pH también pueden modificar corrientes iónicas activadas por voltaje. Este último efecto se ha evaluado sobre todo en

las corrientes iónicas activadas por voltaje que se expresan en el músculo esquelético de mamíferos, por ejemplo: sobre los canales de potasio tipo KCNQ1 [12], y sobre canales de potasio conformados por las subunidades K_v 1.5 y K_v 1.4 [13,14] y la subunidad denominada Kcnk3, que pertenece a la familia de los canales de potasio de dos segmentos de poro, que forman canales iónicos por los cuales pasa la denominada corriente de "fuga" [15]. Cambios de pH parecen afectar también de forma significativa a las corrientes de Ca²⁺ de alto y bajo umbral [4, 16,17], a la corriente de K⁺ activada por Ca²⁺ [18] y a la corriente rectificadora retardada rápida, particularmente en canales conformados por la subunidad HERG [19].

Con base en la multiplicidad de acciones que afectan a la excitabilidad celular, se ha propuesto que los protones (H⁺) extracelulares conforman un sistema de señalización intercelular con una importante función como neuromoduladores en el sistema nervioso central (SNC) y periférico; se ha pensado que incluso pudieran tener una función como neurotransmisores [5, 20,21]. Desde el punto de vista funcional, los cambios de pH extracelular a nivel sináptico pueden ser muy importantes, ya que las vesículas que contienen glutamato, acetilcolina y ácido γ -aminobutírico (GABA) tienen una alta concentración de H⁺. Las vesículas que contienen glutamato llegan a tener un pH aproximado de 5,7 [22], lo que las convierte en una fuente endógena de liberación sináptica de H⁺. La alta concentración de H⁺ en las vesículas sinápticas se debe a que éstas, particularmente las glutamatérgicas, usan una ATPasa de protones para crear un gradiente electroquímico y concentrar así el neurotransmisor en su interior (Fig. 1), lo cual determina que el pH en el lumen de la vesícula sea de alrededor de 5,7 [22,23]. Se ha observado que la actividad sináptica intensa promueve cambios transitorios del pH extracelular. Por ejemplo, en rebanadas de hipocampo, la activación de las colaterales de Schaffer produce un cambio de pH en la zona de la sinapsis que forman con las neuronas piramidales CA1; inicialmente con la acidificación del medio extracelular (~ 10 ms) y posteriormente con la pro-

Aceptado tras revisión externa: 10.10.05.

^a Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla. ^b Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México.

Correspondencia: Dr. Francisco Mercado, Instituto de Fisiología, BUAP, Apartado Postal 406, 72000 Puebla, Puebla (México). Fax: (52)+222-229 3500. E-mail: chimeras@puebla.megared.net.mx

Trabajo realizado gracias a la financiación del Instituto México Estados Unidos de la Universidad de California (UC MEXUS) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT), y por los proyectos VIEP-CONACYT IV 29-04/SAL/G y 9/G/SAL/05. F. Mercado es becario del CONACYT (registro n.º 155844).

© 2005. REVISTA DE NEUROLOGÍA

ducción de un cambio alcalino de mayor duración [3].

Actualmente se conocen distintos tipos de receptores, tanto ionotrópicos como metabotrópicos, que tienen como ligando a los H^+ . Entre los receptores ionotrópicos destacan los canales iónicos ASIC y los TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*, también denominado *vanilloid receptor 1*, VR1) que resultan activados por descensos en el pH extracelular [24]. Por otro lado, se ha encontrado una importante familia de receptores metabotrópicos (acoplados a proteínas G) de protones, los cuales tienen una amplia expresión tisular, principalmente en órganos y tejidos fuera del SNC. Ludwig et al [25] demostraron que el receptor 1 acoplado a proteínas G de cáncer de ovario (OGR1) y el receptor 4 acoplado a proteínas G (GPR4) actúan como sensores de H^+ , promueven la formación de inositol trifosfato (IP_3) e incrementan los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) intracelular. Ambos receptores tienen, como ya mencionamos, una amplia distribución tisular y parecen cumplir una función en la homeostasis del pH en el tejido óseo, sensando la concentración de H^+ . Además, parecen también desempeñar un papel en la regulación de la respiración. Ambos se expresan en células del sistema inmune, donde pudieran participar en procesos de señalización celular, particularmente en casos de inflamación e isquemia. Posteriormente se ha caracterizado también la sensibilidad a H^+ de otros receptores como el receptor G2A (originalmente se identificó a éste como un receptor sin ligando, posteriormente se demostró que es un sitio receptor para lisofosfolípidos) y el receptor del gen 8 asociado a la muerte celular de linfocitos T (TDAG8, del inglés *T cell death-associated gene 8*); todos ellos son también receptores acoplados a proteínas G. Al quedar activado por los H^+ el receptor G2A incrementa los niveles de inositol trifosfato (IP_3) intracelular y este efecto se bloquea por la lisofosfatidilcolina de manera que depende de la dosis [26]. El receptor TDAG8 al resultar activado por H^+ incrementa los niveles de AMPc, y los glicoesfingolípidos reducen la sensibilidad del receptor a los cambios de pH extracelular [27]. Ambos se expresan de forma prominente en linfocitos y macrófagos. Todos estos receptores comparten la característica de pertenecer a la misma familia de proteínas G, por lo cual cuentan con una gran homología en su secuencia de aminoácidos y probablemente desempeñen un papel prominente en la respuesta celular a los lípidos proinflamatorios y cambios tisulares de pH.

OBJETIVO

Este escrito tiene como objetivo hacer una revisión de los canales iónicos tipo ASIC, a los que se ha seguido desde su clonación con mucho interés, y de los que se ha demostrado su participación en distintas modalidades sensoriales, así como en la transmisión sináptica y en procesos como la memoria y el aprendizaje, además de que parecen participar en la fisiopatología

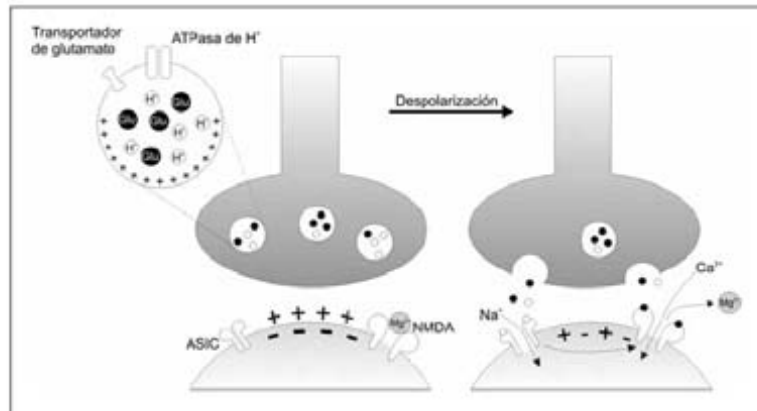


Figura 1. Almacenamiento de glutamato (Glu) en las vesículas sinápticas y posible papel de los ASIC. En el inserto se muestra cómo se almacena el Glu en sus vesículas. El transportador de Glu se vale de un gradiente electroquímico generado por una ATPasa de protones que hace descender el pH en el interior de la vesícula. Una vez que la terminal presináptica está despolarizada se lleva a cabo la fusión de las vesículas con la membrana celular, lo que colibera al espacio sináptico Glu y protones. Los protones activan los ASIC en la neurona postsináptica, ésta se despolariza por la entrada de Na^+ y libera al receptor NMDA del bloqueo que sufre por Mg^{2+} , lo que en última instancia incrementa los niveles de Ca^{2+} intracelular. Modificado de [21].

del choque isquémico y en fenómenos de excitotoxicidad. Hoy en día se cuenta con un gran número de publicaciones en las fuentes bibliográficas que describen su estructura, función, modulación y farmacología. Esta revisión recoge los aspectos fisiológicos más sobresalientes acerca de estos receptores, así como de su participación en condiciones patológicas.

CANALES SENSIBLES A LA CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR DE PROTONES (ASIC)

Desde 1981, Krishtal y Pidoplichko [28] informaron de una conductancia catiónica activada por H^+ en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (GRD) de la rata. Lamentablemente estos resultados electrofisiológicos recibieron poca atención debido a la amplia gama de efectos que producen los cambios de pH extracelular. No fue sino hasta los años noventa cuando se volvió a prestar atención al papel funcional y posibles vías de señalización de los cambios de pH extracelular. Finalmente, Waldmann et al [29] clonaron canales iónicos de membrana sensibles a H^+ , a los cuales se les denominó genéricamente como ASIC. Estos investigadores demostraron que dichas proteínas forman canales iónicos que son el correlato molecular de aquellos que habían descrito los trabajos pioneros del grupo de Krishtal. Las subunidades que componen estos canales se clonaron por su homología con los miembros de la familia ENaC/DEG (*epithelial sodium channel/degenerin*) (Fig. 2), y comparten con ellos las propiedades de formar canales principalmente permeables al ión de sodio y de resultar bloqueados por el diurético amilorida y sus derivados. Cabe destacar que en el caso de la subunidad ASIC1a se ha observado que forma canales también permeables de manera sustancial al ión calcio [20,29-30]. Provenientes de cuatro genes se han clonado seis distintas subunidades que se conocen actualmente como ASIC1a [29], ASIC1b [31], ASIC2a [32], ASIC2b [33], ASIC3 [34], y ASIC4 [35]. Cada subunidad es una proteína pequeña de unos 500 aminoácidos, normalmente glicosilada. Se ha propuesto que estas subunidades se ensam-

cia con que se detectan dichos estímulos sea mayor y no menor [45]. Probablemente este efecto paradójico se deba a una respuesta compensatoria que conlleva a la sobreexpresión de otras moléculas como los TRPV1, o alguna variedad de subunidades ASIC.

Las señales químicas que se producen cuando se somete un tejido a estrés inflamatorio (tales como la secreción de interleucina 2, factor de crecimiento nervioso, serotonina, etc.) secundario a daño tisular incrementan la expresión de ASIC3 en neuronas de los GRD [46,47]. Lo anterior indica la importancia de esta subunidad en la percepción del dolor ya que, ante señales proinflamatorias, se dispone de una cantidad mayor de nociceptores, lo cual puede interpretarse como un aumento en la capacidad del organismo para generar señales de alerta que bien podría además contribuir a explicar algunos cambios en el umbral de percepción de estímulos dolorosos.

Adicionalmente, algunos productos del metabolismo anaerobio, como el ácido láctico, incrementan de manera significativa la corriente a través de los canales ASIC [48]. De la misma manera, algunas otras señales que denotan muerte celular o daño tisular, como lo son el estiramiento de la membrana (que es debido a la hipotonicidad que se produce por la liberación de K^+ al espacio extracelular cuando existe necrosis) y el ácido araquidónico (precursor de las prostaglandinas y tromboxanos), incrementan la corriente de los ASIC en neuronas de cerebelo [49].

En experimentos conductuales llevados a cabo en humanos, se ha evaluado la participación de los canales de tipo ASIC en la percepción del dolor que ocasiona el contacto con sustancias ácidas. Los experimentos se realizaron administrando sustancias ácidas (con $pH < 5$) a través de inyección subcutánea o mediante iontoforesis en voluntarios sanos [50,51]. La sensación de dolor inducida por la sustancia ácida resulta inhibida por la amilorida y por antiinflamatorios no esteroideos (AINE; ver el apartado de 'Farmacología'), lo que hace pensar que el receptor que transduce este estímulo químico a señales eléctricas enviadas al SNC es un miembro de la familia de los ASIC.

Cabe señalar que los descensos en el pH extracelular son capaces de producir despolarizaciones de magnitud suficiente para inducir la descarga de potenciales de acción en las neuronas que expresan ASIC. Esto se ha demostrado, por ejemplo, en las neuronas CA1 del hipocampo y en las de los GRD [52,53]. En el caso de las neuronas de los GRD se requiere de descensos de pH hasta aproximadamente 6,3 para que dispares potenciales de acción, lo que indica que el contacto con soluciones a ese pH, y por debajo de él, devendrá en una sensación dolorosa, hecho que coincide con los experimentos conductuales [50,51].

Se ha sugerido que la combinación de ASIC2a/ASIC2b participa en la respuesta gustativa a los ácidos [54,55]. Mediante técnicas inmunohistoquímicas se han localizado dichas subunidades ASIC en los quimiorreceptores linguales; además, las corrientes iónicas activadas por sustancias ácidas (ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido acético, etc.) en los quimiorreceptores son análogas a las producidas por canales ASIC en otros sistemas, y son sensibles al bloqueo por amilorida. Sin embargo, el ratón que carece de la subunidad ASIC2a (*knockout* de ASIC2a) parece no tener déficit en la sensibilidad gustativa a los ácidos [56], por lo que aún está en discusión la participación de los ASIC en el gusto. Una posible explicación es que en ausencia de ASIC2a la función queda compensada por algún otro tipo de receptor.

Otra modalidad sensorial en la cual se ha observado la participación de los ASIC es el tacto, ya que ratones *knockout* para

los canales ASIC2a y ASIC3 presentan una disminución en la sensación táctil [44,57]. Esto coincide con el hecho de que se ha demostrado que los ASIC2a y ASIC3 se ubican en las terminales nerviosas que inervan los folículos pilosos, corpúsculos de Meissner, terminales nerviosas lanceoladas y terminales nerviosas libres de la piel. Estos resultados corroboran la idea de que los ASIC participan de alguna manera en la mecanotransducción, hecho que no es sorprendente debido a la homología que presentan con las DEG, que en el *C. elegans* son los mecanosensores presentes en la piel.

Se ha postulado que la presencia de los ASIC en el SNC, específicamente en el hipocampo y la corteza [58,59], sería importante en condiciones de isquemia, ya que los descensos en el pH incrementarían la dinámica de disparo de las neuronas que padecen el proceso isquémico, de manera que sería una señal focal de alerta. Recientemente se ha demostrado que la subunidad ASIC1a participa directamente en la fisiopatología de la isquemia en el SNC [2,60], ya que en el ratón *knockout* de ASIC1a el área de daño inducida por la oclusión de la arteria cerebral media se reduce significativamente; la zona isquémica también se reduce con la microinyección intracerebro-ventricular de amilorida (ver 'Farmacología'; concentración final estimada: 100 μM), o de la toxina de tarántula PcTx1 (ver 'Farmacología'; concentración final estimada: 50 ng/mL) en ratones silvestres, lo que demuestra que la muerte neuronal se produce por fenómenos secundarios a la activación de ASIC1a. Se postula que su activación es debida al cambio de pH extracelular característico de la hipoxia. El proceso celular mediante el cual ASIC1a desencadenaría la muerte celular sería la entrada de calcio extracelular a través de este canal [61], ya que se sobrecargaría de calcio el interior celular, lo que finalmente conduciría a la apoptosis. Los autores sugieren que el bloqueo de los ASIC debería considerarse como alternativa terapéutica para el tratamiento de procesos que cursan con isquemia cerebral.

Además de su participación en situaciones patológicas, también se ha dado noticia de que los canales de tipo ASIC1a participan en el mantenimiento de la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *long term potentiation*) en el hipocampo, proceso neuronal que se ha relacionado estrechamente con la memoria y el aprendizaje [62]. Los ratones *knockout* para ASIC1a fallan en el mantenimiento de la LTP [63]. Esto se ha corroborado con pruebas conductuales, en las cuales los ratones carentes de la subunidad mostraron un déficit en pruebas de memoria y aprendizaje espacial. La explicación de este importante fenómeno se basa en que las vesículas sinápticas glutamatérgicas liberadas por las neuronas presinápticas podrían acidificar el espacio sináptico y activar al ASIC1a, despolarizando ligeramente las neuronas postsinápticas y liberando con ello el bloqueo que, en condiciones normales, ejercen los iones Mg^{2+} en los receptores de glutamato del tipo NMDA que, se sabe, son esenciales para el desarrollo de la LTP (Fig. 1) [62,64]. Por otra parte, y de manera paradójica, está bien documentado que los receptores del tipo NMDA tienen un sitio que une H^+ y que disminuye la corriente iónica a través de estos canales [10,11], hecho que también podría determinar una participación significativa del pH en la neuromodulación de la transmisión sináptica [5,21].

FARMACOLOGÍA

En relación con la activación (*gating*) de estos canales, se ha propuesto un mecanismo relativamente novedoso, ya que apa-

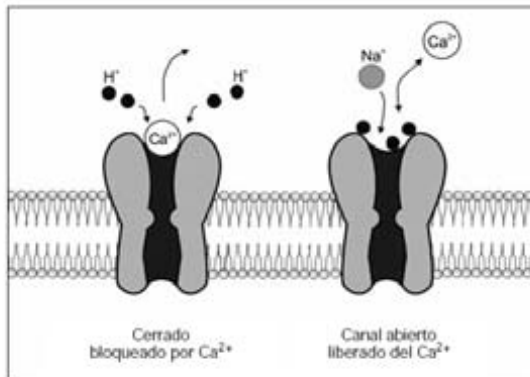


Figura 3. Esquema del mecanismo de activación de los canales ASIC. El estado cerrado es de alta afinidad por el Ca^{2+} (izquierda); al aumentar la concentración extracelular de protones $[\text{H}^+]_o$, el Ca^{2+} queda desplazado del vestibulo del canal, el cual pasa al estado abierto cuando se ligan cuatro protones y se desliga el Ca^{2+} (derecha). Debido a este mecanismo de apertura, las transiciones entre estado cerrado y abierto ocurren con una cinética sumamente rápida. Modificado de [65].

rentemente el poro de los ASIC está constitutivamente abierto, pero se encuentra bloqueado por un ion de calcio, y los H^+ compiten por su sitio de unión desplazándolo [65] (Fig. 3). Una vez que el ion de calcio está desplazado, es posible el paso de iones de sodio (y calcio en ASIC1a) a través del poro del canal [29,30, 61,66]. Por esta razón, los ASIC se consideran como canales iónicos activados por ligando, en este caso los H^+ .

En los últimos años, se ha incrementado significativamente el número de herramientas farmacológicas con las cuales estudiar los ASIC. El único agonista conocido para todos ellos son los H^+ [67], y su antagonista inespecífico es la amilorida [20]. Entre las diferentes subunidades (cuando forman homomultímeros) existe una sensibilidad diferenciada para ambos: ASIC3 es la más sensible a los H^+ ($\text{pH}_{0.5} = 6.5$), y ASIC1a la más sensible a la amilorida ($\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$). La subunidad menos sensible a los H^+ es ASIC2a ($\text{pH}_{0.5} = 4.3$), y la subunidad menos sensible a la amilorida es ASIC3 ($\text{IC}_{50} = 60\text{-}100 \mu\text{M}$) [30].

Los metales pesados –algunos de ellos relativamente abundantes en el organismo, como el cinc (Zn^{2+}), modulan la respuesta de los ASIC a los H^+ [68,69]. Cabe destacar que el Zn^{2+} se libera en las terminales sinápticas hipocámpales en las que se encuentra concentrado en las vesículas sinápticas (en rango μmol) y puede potencialmente resultar coliberado con glutamato y H^+ ; de este modo, en ciertas condiciones competiría por el sitio de unión de los protones (algún residuo aminoácido titutable como la histidina). Se ha encontrado que el Zn^{2+} tiene un efecto paradójico sobre las corrientes ASIC. En dosis bajas produce un bloqueo de alta afinidad en las subunidades ASIC1a, y ASIC1a+2a, con una dosis efectiva media ($\text{IC}_{50} \sim 10 \text{nM}$) [69]; en altas concentraciones ($\text{IC}_{50} \sim 100 \mu\text{M}$) coactiva ASIC2a y ASIC1a+2a [68,69].

El gadolinio (Gd^{3+}) es también un bloqueador de los ASIC con una afinidad relativamente alta [70]. Su efecto es más potente en las subunidades ASIC3 y sobre el heteromultímero ASIC2a+3. En ambos tiene una $\text{IC}_{50} \sim 50 \mu\text{M}$. El Gd^{3+} es un bien conocido bloqueador de mecanotransductores (al igual que otros lantánidos). Ciertos agentes que contienen Gd^{3+} se usan como medio de contraste para los estudios de resonancia magnética y,

aunque se ha considerado que dichos agentes son seguros, no debe descartarse totalmente que pudieran tener algunas acciones biológicas, particularmente en pacientes con disrupción de la barrera hematoencefálica y en aquellos que tienen daño renal, que es la vía de excreción de dichos compuestos.

Los AINE como, por ejemplo, el ácido acetilsalicílico, el ibuprofeno, el diclofenaco y el naproxeno, tienen un efecto bien conocido como inhibidores reversibles o irreversibles de la ciclooxigenasa II (COX-II). Debido a que los ASIC se expresan en neuronas nociceptivas se estudió si los AINE podrían tener efectos ya sea directos o indirectos sobre los ASIC (adicional al conocido sobre la COX-II) [71]. Se encontró que las corrientes iónicas activadas por H^+ mediadas por ASIC en las neuronas de los GRD quedan inhibidas por los AINE. La inhibición de la conductancia de los ASIC por los AINE se encuentra en el rango de concentración (de 1 a 3 mM) que dichos fármacos alcanzan cuando se utilizan en la terapéutica para tratar cefaleas, hipotermia o inflamación; además podría, independientemente de su efecto sobre la COX-II, constituir parte de la explicación del efecto antiinflamatorio y/o analgésico de estas sustancias [72].

Vale la pena destacar que se han descrito al menos dos toxinas con efecto selectivo sobre ASIC. La PeTx1, toxina peptídica aislada del veneno de la tarántula *Psalmopoeus cambridgei*, es un potente y específico bloqueador de los homomultímeros de ASIC1a ($\text{IC}_{50} = 0.9 \text{nM}$) [73]. La toxina APETx2, obtenida de la anémona marina *Anthopleura elegantissima* inhibe la subunidad ASIC3 con una $\text{IC}_{50} = 63 \text{nM}$ [74]. El hecho de que en la naturaleza se hayan desarrollado toxinas concretas para estos canales iónicos nos habla de su alta especificidad funcional y de su amplia distribución filogenética.

Por último, un canal iónico de la familia de los ENaC/DEG, el FaNaC, clonado del caracol de jardín (*Helix aspersa*), que se activa con el neuropéptido FMRF-amida (Phe-Met-Arg-Phe-amida), cuenta con cierta homología en la secuencia de aminoácidos con los ASIC. En mamíferos se ha demostrado que los neuropéptidos relacionados con la FMRF-amida, particularmente el neuropéptido-FF y el neuropéptido-SF, tienen una función moduladora sobre las respuestas nociceptivas, efecto mediado a través de la activación de un receptor acoplado a proteínas G [75]. También se ha demostrado que tanto la FMRF-amida como los neuropéptidos relacionados no activan los canales ASIC por sí solos; sin embargo, incrementan significativamente la corriente de los ASIC evocada por H^+ , así como la excitabilidad de las neuronas de los GRD [52,76]. Estas noticias hacen hincapié en que la interacción entre los neuropéptidos relacionados con la FMRF-amida y el canal es directa, o sea, que el efecto que tienen sobre las corrientes ASIC no está mediado a través de su receptor acoplado a proteínas G. Esto ha permitido relacionar más estrechamente a los ASIC con la nocicepción, y ampliar el alcance de la respuesta fisiológica producida por la liberación de los neuropéptidos relacionados con la FMRF-amida en el sistema nervioso, ya que tendrían dos blancos moleculares: un receptor metabotrópico acoplado a proteínas G, y los ASIC.

Lo anterior podría tener repercusiones fisiológicas relevantes, debido a que la activación de los ASIC requiere descensos de pH relativamente grandes. Sin duda, éste es el problema más interesante en relación con los ASIC: ¿realmente los protones activan los ASIC en el SNC, o éste es un epifenómeno y ellos se activan normalmente por un ligando aún no identificado? Como sea, las evidencias a favor de los protones como ligando de esta

familia de canales es la más abundante y la que, por el momento, tiene consenso en la comunidad académica [67].

OTRAS CORRIENTES IÓNICAS SENSIBLES AL pH

Los receptores vainilloides (TRPV1 o VR1) se expresan típicamente en neuronas nociceptoras. Su clonación ha permitido su estudio detallado y se ha descrito que dichos receptores se activan por distintas señales potencialmente nociceptivas, entre otras por descensos de pH por debajo de 6, por temperaturas mayores a 42 °C y por la capsaicina, que es uno de los ingredientes activos de los chiles picantes [77,78]. En las neuronas de los GRD, los receptores TRPV1 se expresan en las neuronas con axones amielínicos (fibras C) y en las neuronas de las fibras Aδ. Los receptores del tipo ASIC y TRPV1 se distribuyen en el mismo grupo de neuronas, por lo que se piensa que su función es complementaria.

Los canales de K⁺ de dos poros (4TMD-2P) del tipo TASK (*two pore-domain acid sensitivity K⁺ channel*) se han descrito como el correlato molecular de corrientes de fuga sensibles al pH [79-81]. La sensibilidad al pH de las subunidades TASK1 y TASK3 se encuentra muy cerca del pH fisiológico. Estos canales cuentan con una farmacología muy bien caracterizada en la que destacan los hechos de que sus agonistas son los anestésicos volátiles halotano e isoflurano, y de que resultan inhibidos por acidosis, anandamida y el rojo de rutenio. Además, reciben una importante modulación negativa por parte del receptor muscarínico M3 que opera a través de proteínas de tipo Gq. Se piensa que estos receptores, que están tan ampliamente distribuidos en el SNC, son los blancos moleculares de los anestésicos volátiles, ya que cuando la actividad de estos canales iónicos se incrementa, disminuye considerablemente la excitabilidad de las neuronas que los expresan.

ASIC EN EL OÍDO INTERNO

Diversos grupos de investigación han estudiado la presencia de canales de la familia de los ENaC/degenerina/ASIC en el oído interno. La mayor parte de estos trabajos se han orientado a estudiar el transporte iónico en la cóclea [82-84] o la mecanotransducción [85-87]. Las subunidades α , β y γ de ENaC se expresan en las regiones epiteliales y no epiteliales de la cóclea, incluido el ganglio espiral. Se ha propuesto que su función está relacionada con el mantenimiento de las bajas concentraciones de Na⁺ endolinfático que contribuye a la generación del potencial endococlear [82-84], lo cual explica en parte el desarrollo de una sordera congénita en los ratones *knockout* para ASIC3 [86].

Debido principalmente a que las degenerinas (MEC4 y MEC10), familia a la cual pertenecen los ASIC (Fig. 1), se han asociado con la mecanotransducción, y a que la transducción mecanoeléctrica en las células ciliadas en vertebrados es sensible a la anulorida [88], varios autores han buscado en esta familia de canales la probable identidad de los canales mecanotransductores de los sistemas de células ciliadas [85-87]. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que los canales de mecanotransducción en las células ciliadas de los vertebrados están relacionados con la familia de canales *transient receptor potential* (TRP) [89]; en particular, se ha demostrado que el bloqueo de la expresión de genes que codifican para canales *nompC* en el pez cebra interfieren con la mecanotransducción en la línea lateral [90,91]. Recientemente, se informó de que la expresión

del canal TRPA1 (también denominado ANKTM1) en las células ciliadas coincide con el desarrollo de la mecanosensibilidad; los anticuerpos antiTRPA1 marcan los ápices de los cilios (en la región en que, se ha propuesto, se localizan los canales mecanotransductores), y la inhibición de la expresión de los genes que codifican para el canal TRPA1 mediante oligonucleótidos morfolinoicos –tanto en el pez cebra como en ratones– inhibe la mecanosensibilidad de las células ciliadas, hecho que se acompaña además de la inhibición de la acumulación de un trazador fluorescente (FM1-43) al cual estos canales son permeables [92]. Estos resultados apuntan de forma muy sólida a la familia de canales TRP, y no a los ENaC/DEG/ASIC, como la que más probablemente subyace a la mecanorrección en células ciliadas.

Mediante estudios de inmunohistoquímica y RT-PCR en la cóclea de ratón, se ha demostrado la expresión de la subunidad ASIC3, predominantemente en las neuronas del ganglio espiral [86]. Igualmente en la cóclea, se ha observado con un modelo de ratón *knockout* de ASIC2 (que incluye las variantes de *splitting* ASIC2a y/o 2b) que esta subunidad determina la expresión de corrientes iónicas activadas por H⁺ en el ganglio espiral, y que podría participar en la modulación de estímulos auditivos supraumbrales [93]. En el sistema vestibular de la rata se han clonado dos subunidades ASIC, la 4 y la 1b [35,66], y a través de RT-PCR se amplificó el ADN complementario (ADNc) para estas subunidades. Su papel funcional aún no está claro dentro de esta modalidad sensorial, y los autores no hacen propuesta alguna respecto a su posible papel funcional en el vestibulo.

Cabe hacer notar que otros canales sensibles al pH extracelular, como los receptores vainilloides (TRPV1), se han amplificado a través de RT-PCR del aparato vestibular de la rata [94]; también en el órgano de Corti se ha descrito la expresión del receptor TRPV1, y se encontró que su agonista, la capsaicina, modifica la respuesta tonotópica de las células de la cóclea [95].

MODULACIÓN DE LA DESCARGA AFERENTE EN EL VESTÍBULO POR pH EXTRACELULAR

Nuestro grupo de trabajo se ha interesado por el efecto modulador que tienen los protones sobre la actividad eléctrica aferente del nervio vestibular [96]. El registro extracelular multiunitario del nervio del canal semicircular posterior del vestibulo del axolotl ha mostrado que la actividad eléctrica de las neuronas aferentes de los canales semicirculares es muy sensible a cambios del pH extracelular, y que la FMRF-amida produce un efecto excitador sobre la descarga de las neuronas aferentes vestibulares. En este mismo trabajo se demostró que dichos cambios se deben en gran medida a la sensibilidad de los receptores glutamatérgicos por los H⁺. De este modo, la evidencia que relaciona al pH y la neuromodulación y neurotransmisión es cada día más abundante.

La modulación de la descarga de las neuronas aferentes vestibulares por cambios en el pH puede tener un importante papel funcional, ya que se ha propuesto (como lo mencionamos anteriormente) que las terminales glutamatérgicas liberan hidrogeniones. Esto implica que la liberación de neurotransmisor por las células ciliadas glutamatérgicas [97,98] puede producir cambios significativos en el pH del medio acidificándolo, tal como se ha demostrado que ocurre en la retina [4,99,100].

Amén de la influencia 'sináptica' que pudieran ejercer los protones que se liberan junto con el neurotransmisor, ciertos cambios sistémicos de pH podrían ocurrir durante estados de acidosis

o alcalosis metabólica. Se ha dado noticia de que estos cambios tienen influencia en los síntomas de la enfermedad de Ménière [101] y pueden ser una causa de recurrencia de vértigo en pacientes con disfunción vestibular [102]. Por otro lado, se ha observado que estímulos eléctricos similares a los utilizados en implantes cocleares producen importantes cambios en el pH en la región adyacente al electrodo de estimulación, hecho que podría contribuir significativamente a la respuesta neuronal que provocan dichos electrodos, y explicar algunos de los fenómenos sensoriales que se observan en pacientes con estos implantes [103].

CONCLUSIONES

Los canales ASIC se encuentran distribuidos ampliamente en el SNC y periférico en muy diversas especies. Están directamente relacionados con la percepción del dolor y son un blanco farmacológico adicional de los AINE. Desempeñan un importante papel en el tacto y se distribuyen en varios de los receptores especializados en esta modalidad sensorial. Igualmente parecen participar en la percepción del sabor ácido. Su función más intrigante se encuentra en el SNC. A juzgar por los resultados experimentales presentados hasta el momento, es altamente probable que participen activamente en la neurotransmisión, sobre todo en sinapsis glutamatérgicas. La definición precisa de su papel funcional abre nuevas vías de investigación que seguramente contribuirán a nuestra comprensión de los complejos procesos de señalización celular que ocurren en el SNC, y que apuntan hacia una concepción que rebasa con mucho el concepto tradicional de la transmisión sináptica mediada por un neurotransmisor y un conjunto de receptores excitadores o inhibidores. Actualmente, luego de descubrimientos como el relacionado con el papel del óxido nítrico [104,105], estamos obligados a pensar en procesos de comunicación puntual (sinapsis clásicas) y en procesos de comunicación dependientes del estado metabólico y de la actividad de grupos neuronales (no ya neuronas únicas) altamente modulables. Es de destacar la función que de-

sempeñan los ASIC en la fisiopatología del choque isquémico. La evidencia experimental indica que participan de forma importante en fenómenos de excitotoxicidad y los señala como los principales responsables de la sobrecarga de calcio intracelular que conduce a la muerte neuronal. Se ha sugerido que una estrategia terapéutica que apunte hacia el bloqueo de estos canales podría prevenir el crecimiento de la zona isquémica ocasionada por la oclusión de una arteria.

Aún quedan algunas preguntas fundamentales por responder con respecto a los ASIC: ¿existen ligandos específicos a los ASIC en el SNC de los mamíferos? O, como se ha pensado, ¿son realmente los protones el ligando específico?, ¿cómo es su interacción con otro tipo de receptores, como los NMDA? ¿Existen otros miembros de esta familia de receptores?

Precisar la fisiología de los ASIC en los próximos años podría ser la clave para encontrar nuevas alternativas terapéuticas ante problemas como el tratamiento del dolor. Aunque éste es un campo de investigación relativamente reciente, las perspectivas para la investigación básica y clínica son excelentes. Uno de los aspectos más interesantes es la búsqueda de bloqueadores, de origen natural o sintético, específicos para cada una de las subunidades que componen estos canales iónicos; en esta dirección el grupo de Lazdunski en Francia ha hecho una considerable aportación con el aislamiento de dos toxinas específicas (ver 'Farmacología'). Con el auxilio de estas herramientas ha sido posible, por ejemplo, diseccionar la función de ASIC1a en la fisiopatología del proceso isquémico. Definir el papel diferencial de las subunidades ASIC parece primordial, ya que su expresión se traslapa en casi todos los tipos celulares en los que se ha estudiado, y ha crecido -de algún modo- confusión acerca de su función, por ello parece indispensable contar con herramientas farmacológicas más específicas y selectivas. Definir con precisión la participación de estos canales en la transmisión sináptica en el sistema nervioso, así como su papel en los procesos de aprendizaje constituye otro aspecto que por su relevancia tiene un gran impacto potencial en el desarrollo de las neurociencias.

BIBLIOGRAFÍA

- Chesler M. Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev* 2003; 83: 1183-221.
- Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, Minami M, Hey J, Wei WL, et al. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell* 2004; 118: 687-98.
- Krishtal OA, Osipchuk YV, Shelest TN, Smirnov SV. Rapid extracellular pH transients related to synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1987; 436: 352-6.
- DeVries SH. Exocytosed protons feedback to suppress the Ca^{2+} current in mammalian cone photoreceptors. *Neuron* 2001; 32: 1107-17.
- Traynelis SF, Chesler M. Proton release as a modulator of presynaptic function. *Neuron* 2001; 32: 960-2.
- Stoop R, Surprenant A, North RA. Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. *J Neurophysiol* 1997; 78: 1837-40.
- Abdrakhmanova G, Dorfman J, Xiao Y, Morad M. Protons enhance the gating kinetics of the $\alpha 3/\beta 4$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor by increasing its apparent affinity to agonists. *Mol Pharmacol* 2002; 61: 369-78.
- Krishek BJ, Smart TG. Proton sensitivity of rat cerebellar granule cell GABAA receptors: dependence on neuronal development. *J Physiol* 2001; 530: 219-33.
- Ihle EC, Patneau DK. Modulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor desensitization by extracellular protons. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 1204-12.
- Tang CM, Dichter M, Morad M. Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H^+ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6445-9.
- Traynelis SF, Cull-Candy SG. Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature* 1990; 345: 347-50.
- Peretz A, Schottelndreier H, Aharon-Shamgar LB, Attali B. Modulation of homomeric and heteromeric KCNQ1 channels by external acidification. *J Physiol* 2002; 545: 751-66.
- Kehl SJ, Eduljee C, Kwan DC, Zhang S, Fedida D. Molecular determinants of the inhibition of human Kv1.5 potassium currents by external protons and Zn^{2+} . *J Physiol* 2002; 541: 9-24.
- Claydon TW, Boyett MR, Sivaprasadarao A, Ishii K, Owen JM, O'Beirne HA, et al. Inhibition of the K^+ channel Kv1.4 by acidosis: protonation of an extracellular histidine slows the recovery from N-type inactivation. *J Physiol* 2000; 526: 253-64.
- Lopes CM, Zilberberg N, Goldstein SA. Block of $Ken3$ by protons. Evidence that 2-P-domain potassium channel subunits function as homodimers. *J Biol Chem* 2001; 276: 24449-52.
- Tytgat J, Nilus B, Carmeliet E. Modulation of the T-type cardiac Ca channel by changes in proton concentration. *J Gen Physiol* 1990; 96: 973-90.
- Shah MJ, Meis S, Munsch T, Pape HC. Modulation by extracellular pH of low- and high-voltage-activated calcium currents of rat thalamic relay neurons. *J Neurophysiol* 2001; 85: 1051-8.
- Laurido C, Candia S, Wolff D, Latorre R. Proton modulation of a Ca^{2+} -activated K^+ channel from rat skeletal muscle incorporated into planar bilayers. *J Gen Physiol* 1991; 98: 1025-42.
- Anumonwo JM, Horta J, Delmar M, Taffet SM, Jalife J. Proton and zinc effects on HERG currents. *Biophys J* 1999; 77: 282-98.
- Waldmann R, Lazdunski M. H^+ -gated cation channels: neuronal acid sensors in the Na $^+$ /DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 418-24.
- Bianchi L, Driscoll M. Protons at the gate: DEG/ENaC ion channels help us feel and remember. *Neuron* 2002; 34: 337-40.

22. Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 1998; 394: 192-5.
23. Ozkan ED, Ueda T. Glutamate transport and storage in synaptic vesicles. *Jpn J Pharmacol* 1998; 77: 1-10.
24. Reeh PW, Kress M. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 45-51.
25. Ludwig MG, Vanek M, Guerin D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, et al. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* 2003; 425: 93-8.
26. Murakami N, Yokomizo T, Okuno T, Shimizu T. G2A is a proton-sensing G-protein-coupled receptor antagonized by lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem* 2004; 279: 42484-91.
27. Wang JQ, Kou J, Mogi K, Tobo M, Damirin A, Sato K, et al. TDAG8 is a proton-sensing and psychosine-sensitive G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 2004; 279: 45626-33.
28. Krishnal OA, Pridoplichko VI. A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception. *Neuroscience* 1981; 6: 2599-601.
29. Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 1997; 386: 173-7.
30. Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* 2002; 82: 735-67.
31. Chen CC, England S, Akopian AN, Wood JN. A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 10240-5.
32. Price MP, Snyder PM, Welsh MJ. Cloning and expression of a novel human brain Na⁺ channel. *J Biol Chem* 1996; 271: 7879-82.
33. Lingueglia E, De Weille JR, Bassilana F, Heurteaux C, Sakai H, Waldmann R, et al. A modulatory subunit of acid-sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 29778-83.
34. Waldmann R, Bassilana F, De Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem* 1997; 272: 20975-8.
35. Grunder S, Geissler HS, Bassler EL, Ruppersberg JP. A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. *Neuroreport* 2000; 11: 1607-11.
36. Coscoy S, Lingueglia E, Lazdunski M, Barbry P. The Phe-Met-Arg-Phe-amide-activated sodium channel is a tetramer. *J Biol Chem* 1998; 273: 8317-22.
37. Benson CJ, Xie J, Wemmie JA, Price MP, Hens JM, Welsh MJ, et al. Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺ gated channels in mouse sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2338-43.
38. Hesselager M, Timmermann DB, Ahning PK. pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits. *J Biol Chem* 2004; 279: 11006-15.
39. Akopian AN, Chen CC, Ding Y, Cesare P, Wood JN. A new member of the acid-sensing ion channel family. *Neuroreport* 2000; 11: 2217-22.
40. Wemmie JA, Askwith CC, Lamani E, Cassell MD, Freeman JH Jr, Welsh MJ. Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *J Neurosci* 2003; 23: 5496-502.
41. Alvarez de la Rosa D, Krueger SR, Kolar A, Shao D, Fitzsimonds RM, Canessa CM. Distribution, subcellular localization and ontogeny of ASIC1 in the mammalian central nervous system. *J Physiol* 2003; 546: 77-87.
42. Sutherland SP, Benson CJ, Adelman JP, McCleskey EW. Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 711-6.
43. Sugura T, Dang K, Lamb K, Bielefeldt K, Gebhart GF. Acid-sensing properties in rat gastric sensory neurons from normal and ulcerated stomach. *J Neurosci* 2005; 25: 2617-27.
44. Price MP, McIlwrath SL, Xie J, Cheng C, Qiao J, Tarr DE, et al. The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 2001; 32: 1071-83.
45. Chen CC, Zimmer A, Sun WH, Hall J, Brownstein MJ, Zimmer A. A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8992-7.
46. Mamet J, Baron A, Lazdunski M, Voilley N. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 2002; 22: 10662-70.
47. Mamet J, Lazdunski M, Voilley N. How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *J Biol Chem* 2003; 278: 48907-13.
48. Immke DC, McCleskey EW. Lactate enhances the acid-sensing Na⁺ channel on ischemia-sensing neurons. *Nat Neurosci* 4: 869-70.
49. Allen NJ, Attwell D. Modulation of ASIC channels in rat cerebellar Purkinje neurons by ischaemia-related signals. *J Physiol* 2002; 543: 521-9.
50. Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Nishigaki M, Shibata Y, Shimada S. Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J Clin Invest* 2002; 110: 1185-90.
51. Jones NG, Slater R, Cadiou H, McNaughton P, McMahon SB. Acid-induced pain and its modulation in humans. *J Neurosci* 2004; 24: 10974-9.
52. Deval E, Baron A, Lingueglia E, Mazarguil H, Zajac JM, Lazdunski M. Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid-sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology* 2003; 44: 662-71.
53. Vukicevic M, Kellenberger S. Modulatory effects of acid-sensing ion channels on action potential generation in hippocampal neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C682-90.
54. Lin W, Ogura T, Kannamon SC. Acid-activated cation currents in rat vallate taste receptor cells. *J Neurophysiol* 2002; 88: 133-41.
55. Ugawa S, Yamamoto T, Ueda T, Ishida Y, Inagaki A, Nishigaki M, et al. Amiloride-insensitive currents of the acid-sensing ion channel-2a (ASIC2a)/ASIC2b heteromeric sour-taste receptor channel. *J Neurosci* 2003; 23: 3616-22.
56. Richter TA, Dvoryanchikov GA, Roper SD, Chaudhari N. Acid-sensing ion channel-2 is not necessary for sour taste in mice. *J Neurosci* 2004; 24: 4088-91.
57. Price MP, Lewin GR, McIlwrath SL, Cheng C, Xie J, Heppenstall PA, et al. The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature* 2000; 407: 1007-11.
58. Varming T. Proton-gated ion channels in cultured mouse cortical neurons. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1875-81.
59. Baron A, Waldmann R, Lazdunski M. ASIC-like, proton-activated currents in rat hippocampal neurons. *J Physiol* 2002; 539: 485-94.
60. Benveniste M, Dingledine R. Limiting stroke-induced damage by targeting an acid channel. *N Engl J Med* 2005; 352: 85-6.
61. Yermolaeva O, Leonard AS, Schmalzer MK, Abboud FM, Welsh MJ. Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 6752-7.
62. Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 1996; 87: 1327-38.
63. Wemmie JA, Chen J, Askwith CC, Hruska-Hageman AM, Price MP, Nolan BC, et al. The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* 2002; 34: 463-77.
64. Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 1986; 319: 774-6.
65. Immke DC, McCleskey EW. Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca²⁺ blockade. *Neuron* 2003; 37: 75-84.
66. Bassler EL, Ngo-Anh TJ, Geisler HS, Ruppersberg JP, Grunder S. Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b. *J Biol Chem* 2001; 276: 33782-7.
67. Krishnal O. The ASICs: signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci* 2003; 26: 477-83.
68. Baron A, Schaefer L, Lingueglia E, Champigny G, Lazdunski M. Zn²⁺ and H⁺ are coactivators of acid-sensing ion channels. *J Biol Chem* 2001; 276: 35361-7.
69. Chu XP, Wemmie JA, Wang WZ, Zhu XM, Saugstad JA, Price MP, et al. Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 2004; 24: 8678-89.
70. Babinski K, Catarsi S, Biagini G, Seguela P. Mammalian ASIC2a and ASIC3 subunits co-assemble into heteromeric proton-gated channels sensitive to Gd³⁺. *J Biol Chem* 2000; 275: 28519-25.
71. Voilley N, De Weille J, Mamet J, Lazdunski M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci* 2001; 21: 8026-33.
72. Voilley N. Acid-sensing ion channels (ASICs): new targets for the analgesic effects of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004; 3: 71-9.
73. Escoubas P, De Weille JR, Lecoq A, Diochot S, Waldmann R, Champigny G, et al. Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *J Biol Chem* 2000; 275: 25116-21.
74. Diochot S, Baron A, Rash LD, Deval E, Escoubas P, Scanzello S, et al. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J* 2004; 23: 1516-25.
75. Panula P, Kalso E, Nieminen M, Kontinen VK, Brandt A, Pertovaara A. Neuropeptide FF and modulation of pain. *Brain Res* 1999; 848: 191-6.
76. Askwith CC, Cheng C, Ikuma M, Benson C, Price MP, Welsh MJ. Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels. *Neuron* 2000; 26: 133-41.
77. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD,

- Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389: 816-24.
78. Tomimaga M, Caterina MJ, Malmborg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998; 21: 531-43.
79. Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F793-801.
80. Patel AJ, Honore E. Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci* 2001; 24: 339-46.
81. Patel AJ, Lazdunski M. The 2P-domain K⁺ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *PLoS Arch* 2004; 448: 261-73.
82. Couloigner V, Fay M, Djelidi S, Farman N, Escoubet B, Runembert I, et al. Location and function of the epithelial Na channel in the cochlea. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F214-22.
83. Grunder S, Müller A, Ruppersberg JP. Developmental and cellular expression pattern of epithelial sodium channel alpha, beta and gamma subunits in the inner ear of the rat. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 641-8.
84. Zhong SX, Liu ZH. Immunohistochemical localization of the epithelial sodium channel in the rat inner ear. *Hear Res* 2004; 193: 1-8.
85. Hoger U, French AS. Extracellular acid increases the open probability of transduction channels in spider mechanoreceptors. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 2311-6.
86. Hildebrand MS, De Silva MG, Klockars T, Rose E, Price M, Smith RJ, et al. Characterisation of DRASIC in the mouse inner ear. *Hear Res* 2004; 190: 149-60.
87. Roza C, Puel JL, Kress M, Baron A, Duchot S, Lazdunski M, et al. Knockout of the ASIC2 channel in mice does not impair cutaneous mechanosensation, visceral mechanonociception and hearing. *J Physiol* 2004; 558: 659-69.
88. Jørgensen F, Ohnori H. Amiloride blocks the mechano-electrical transduction channel of hair cells of the chick. *J Physiol* 1988; 403: 577-88.
89. Clapham D. TRP as cellular sensors. *Nature* 2003; 426: 517-24.
90. Sidi S, Friedrich RW, Nicolson T. NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science* 2003; 301: 96-9.
91. Corey DP. New TRP channels in hearing and mechanosensation. *Neuron* 2003; 39: 585-8.
92. Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, et al. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 2004; 432: 723-30.
93. Peng BG, Ahmad S, Chen S, Price MP, Lin X. Acid-sensing ion channel 2 contributes a major component to acid-evoked responses in spiral ganglion neurons and plays a role in noise susceptibility of mice. *J Neurosci* 2004; 24: 10167-75.
94. Balaban CD, Zhou J, Li HS. Type I vanilloid receptor expression by mammalian inner ear ganglion cells. *Hear Res* 2003; 175: 165-70.
95. Zheng J, Dai C, Steyger PS, Kim Y, Vass Z, Ren T, et al. Vanilloid receptors in hearing: altered cochlear sensitivity by vanilloids and expression of TRPV1 in the organ of corti. *J Neurophysiol* 2003; 90: 444-55.
96. Vega R, Mercado F, Chávez H, Lumón A, Almanza A, Ortega A, et al. pH modulates the vestibular afferent discharge and its response to excitatory amino acids. *Neuroreport* 2003; 14: 1327-8.
97. Soto E, Vega R. Actions of excitatory amino acid agonists and antagonists on the primary afferents of the vestibular system of the axolotl (*Amblystoma mexicanum*). *Brain Res* 1988; 462: 104-11.
98. Soto E, Flores A, Erosteigui C, Vega R. Evidence for NMDA receptor in the afferent synaptic transmission of the vestibular system. *Brain Res* 1994; 633: 289-96.
99. Lilley S, LeTissier P, Robbins J. The discovery and characterization of a proton-gated sodium current in rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2004; 24: 1013-22.
100. Palmer MJ, Hull C, Vigh J, Von Gersdorff H. Synaptic cleft acidification and modulation of short-term depression by exocytosed protons in retinal bipolar cells. *J Neurosci* 2003; 23: 11332-41.
101. Celestino D, Cerulli N, Iannetti G, Saggiocchi G. Acid-base equilibrium in Ménière's disease. *J Laryngol Otol* 1976; 90: 263-75.
102. Morinaka S. Effect of experimental acidosis on nystagmus in rabbits. *Acta Otolaryngol* 1994; 114: 130-4.
103. Huang CQ, Carter PM, Shepherd RK. Stimulus induced pH changes in cochlear implants: an in vitro and in vivo study. *Ann Biomed Eng* 2001; 29: 791-802.
104. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347: 768-70.
105. Boehning D, Snyder SH. Novel neural modulators. *Annu Rev Neurosci* 2003; 26: 105-31.

CANALES IÓNICOS SENSIBLES A LA CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR DE PROTONES: ESTRUCTURA, FUNCIÓN, FARMACOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA

Resumen. Objetivo. Realizar una revisión sobre los canales iónicos ASIC (acid sensing ion channels), los cuales se han investigado arduamente desde su clonación; se ha podido demostrar su participación en diversas modalidades sensoriales incluyendo la nocicepción, así como en la transmisión sináptica, procesos de memoria y aprendizaje y en la fisiopatología del daño por isquemia cerebral. Desarrollo. La concentración de protones en el organismo está regulada de manera muy estricta por distintos sistemas amortiguadores. Cambios drásticos de pH se generan únicamente bajo condiciones patológicas como la isquemia; sin embargo, algunos procesos fisiológicos producen cambios locales de pH extracelular. Recientemente, se ha clonado una nueva familia de receptores de protones conocida como ASIC. Estos son canales iónicos que se encuentran inactivos al pH fisiológico (7,4) y se activan cuando el pH desciende, son permeables al ión de sodio y en menor medida al de calcio, y al activarse incrementan la excitabilidad de la célula que los expresa. Se encuentran distribuidos ampliamente en el sistema nervioso central y periférico, así como en epitelios especializados. En los últimos años su estudio se ha intensificado debido a su papel en la nocicepción, en la percepción gustativa, en la potenciación de larga duración y en la fisiopatología de la isquemia cerebral. Conclusiones. En esta revisión se discuten los aspectos moleculares, fisiológicos y farmacología de los ASIC, su participación en algunos procesos patológicos y las perspectivas de investigación básica y clínica en este incipiente campo de investigación. [REV NEUROL 2005; 41: 667-75]

Palabras clave. ASIC. Fisiología. Mecanotransducción. Neuromodulación. Nocicepción. Protones.

CANAIS IÓNICOS SENSÍVEIS À CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR DE PROTÕES: ESTRUCTURA, FUNÇÃO, FARMACOLOGIA E FISIOPATOLOGIA

Resumo. Objetivo. Realizar uma revisão sobre os canais iônicos ASIC (acid sensing ion channels), os quais têm sido amplamente investigados desde a sua clonagem; conseguiu-se demonstrar a sua participação em diversas modalidades sensoriais incluindo a nociceptora, assim como na transmissão sináptica, processos de memória e aprendizagem e na fisiopatologia da lesão devido à isquemia cerebral. Desenvolvimento. A concentração de prótons no organismo está regulada de maneira muito rigorosa por distintos sistemas amortecedores. Alterações drásticas de pH ocorrem unicamente sob condições patológicas como a isquemia; no entanto, alguns processos fisiológicos produzem alterações locais de pH extracelular. Recentemente, clonou-se uma nova família de receptores de prótons conhecida como ASIC. Estes são canais iónicos que se encontram inactivados com pH fisiológico (7,4), sendo activados com a descida do pH, são permeáveis aos íons de sódio e em menor grau aos de cálcio, e ao serem activados aumentam a excitabilidade da célula que os expressa. Encontram-se amplamente distribuídos no sistema nervoso central e periférico, assim como em epitélios especializados. Nos últimos anos o seu estudo intensificou-se devido ao seu papel como nociceptor, na percepção gustativa, na potenciação de longa duração e na fisiopatologia da isquemia cerebral. Conclusões. Nesta revisão são discutidos os aspectos moleculares, fisiológicos e a farmacologia dos ASIC, a sua participação em alguns processos patológicos e as perspectivas de investigação básica e clínica neste incipiente campo de investigação. [REV NEUROL 2005; 41: 667-75]

Palavras chave. ASIC. Fisiologia. Mecanotransdução. Neuromodulação. Nociceptor. Protões.