



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EFFECTOS DE LA NICOTINA SOBRE LA CORRIENTE
DE POTASIO Y RECEPTORES NICOTÍNICOS EN
ASTROCITOS DE LA REGIÓN CA1 DE HIPOCAMPO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

MIRIAM HERNÁNDEZ MORALES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA



JURIQUILLA, QUERÉTARO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Por mi raza hablará el espíritu.

José Vasconcelos

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la UNAM, contando con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) con el número de becario 181169 y de la **DGEP-UNAM**.

Agradezco enormemente a la

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

por ser la institución a la que debo mi formación en la investigación científica y

porque es un honor ser universitaria.

Agradezco al **Dr. José Jesús García Colunga** por haber dirigido el proyecto y la tesis que desarrollé en el doctorado.

Agradezco a los integrantes del comité tutorial, el **Dr. Miguel A. Morales Mendoza** y la **Dra. Sofía Y. Díaz Miranda** por las aportaciones que hicieron durante mi formación en el doctorado.

Agradezco al **Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas** por el apoyo otorgado para mi asistencia y participación en congresos nacionales e internacionales, y al **Programa de Movilidad Estudiantil-UNAM** por el apoyo para la estancia de investigación.

Agradezco a la responsable del área de enseñanza, **Química Leonor Casanova Rico**, y también a **María del Carmen Vázquez** por su ayuda administrativa.

Agradezco el apoyo brindado por los bibliotecarios **Pilar Galarza Barrios** y **Rafael Silva Cruz** en el acopio de material bibliográfico.

Agradezco el apoyo de los miembros los servicios y unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología representadas por el **MVZ. José Martín García Servín**, y la **Lic. Ma. De Lourdes Lara Ayala**.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES	3
I. Nicotina	3
A. Absorción, distribución y eliminación de la nicotina	3
B. Receptores nicotínicos	6
C. Cambios de la concentración de calcio intracelular por nicotina	7
D. Distribución de receptores nicotínicos en el sistema nervioso central	9
E. Efectos de la nicotina en canales iónicos activados por voltaje	11
II. Efectos de la nicotina en el hipocampo	12
A. Estructura del hipocampo, neuronas y células gliales	12
B. Receptores nicotínicos y efectos de la nicotina en neuronas de hipocampo	17
III. Astrocitos de hipocampo	18
A. Funciones de los astrocitos, modulación de la transmisión sináptica	18
B. Receptores nicotínicos en células gliales	20
C. Canales de potasio en astrocitos de hipocampo	22
CAPÍTULO 3: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
CAPÍTULO 4: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
I. Hipótesis	26

II. Objetivo general	27
III. Objetivos particulares	27
CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS	29
I. Cultivo de astrocitos de la región CA1 de hipocampo	29
II. Ensayos inmunocitoquímicos para identificar astrocitos	31
III. Registros electrofisiológicos	32
IV. Registro de las variaciones de la concentración de calcio intracelular	33
V. Aplicación de las sustancias	34
VI. Sustancias	35
CAPÍTULO 6: RESULTADOS	36
I. Identificación de los astrocitos en cultivo	36
II. Respuestas eléctricas generadas por nicotina en astrocitos de hipocampo	39
A. Aumento y disminución de la corriente transmembranal producidos por nicotina	41
B. Activación de receptores nicotínicos	46
C. Inhibición de las corrientes iónicas por nicotina	49
D. Inhibición de las corrientes de potasio por nicotina	52
III. Aumento de la concentración de calcio intracelular generado por nicotina en astrocitos de hipocampo	58
A. Cambios de la concentración de calcio intracelular generados por agonistas de receptores nicotínicos	64
B. Aumento de la concentración de calcio intracelular generado por nicotina en presencia de antagonistas de receptores nicotínicos	66

CAPÍTULO 7: <i>DISCUSIÓN</i>	71
CAPÍTULO 8: <i>CONCLUSIONES</i>	81
APÉNDICES	82
Apéndice 1. Estructura molecular de los receptores nicotínicos	82
Apéndice 2. Estructura molecular de los canales de potasio	86
Apéndice 3. Artículo publicado	89
CAPÍTULO 9: <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	98
CAPÍTULO 10: <i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	111

RESUMEN

La nicotina, principal componente adictivo del tabaco, además de ser agonista de receptores de acetilcolina de tipo nicotínico, inhibe directamente canales de potasio. En el presente trabajo estudiamos estos dos efectos de la nicotina en astrocitos en cultivo de la región CA1 de hipocampo, los cuales expresan tanto receptores nicotínicos como canales de potasio. Para ello, registramos la corriente iónica a través de la membrana y los cambios en la concentración de calcio intracelular. Así, en ~36% de astrocitos la nicotina generó una corriente iónica que fue inhibida por mecamilamina (antagonista no selectivo de receptores nicotínicos), debido a la activación de receptores nicotínicos. En todos los astrocitos examinados, la nicotina en presencia de antagonistas de receptores nicotínicos, al igual que el tetraetilamonio, inhibió una corriente de potasio, al parecer por la interacción directa entre la nicotina y los canales de potasio. Por otro lado, la nicotina sola, la nicotina en presencia de antagonistas de receptores nicotínicos, y el tetraetilamonio aumentaron la concentración de calcio libre intracelular en los astrocitos. Los resultados revelan que en los astrocitos de la región CA1 de hipocampo la nicotina ejerce dos efectos, la activación de receptores nicotínicos y la inhibición directa de corrientes de potasio, y la consecuencia de ambos efectos es el aumento de la concentración de calcio libre intracelular.

ABSTRACT

Nicotine, the main addictive substance in tobacco, is a nicotinic acetylcholine receptors agonist, as well as an inhibitor of potassium channels. Here, we examined these effects in cultured astrocytes from the CA1 region of the hippocampus, which express both, nicotinic receptors and potassium channels. The nicotine effects in astrocytes were assessed using electrical and calcium recordings. Thus, of astrocytes examined in ~36%, nicotine generated an ion current mediated by the activation of nicotinic receptors that was inhibited by mecamylamine (a non-selective nAChR antagonist). In all examined astrocytes, in the presence of a cocktail of nicotinic receptor antagonists, nicotine inhibited a non-decaying potassium current, similar to tetraethylammonium. This result strongly suggests that nicotine acts directly on ion channels. On the other hand, nicotine in the presence and in the absence of nicotinic receptor antagonists, and the tetraethylammonium are able to increase intracellular calcium concentration in astrocytes. Therefore, our results indicate that nicotine produces two effects in cultured astrocytes from the CA1 region of the rat hippocampus, the activation of nicotinic receptors and the directly inhibition of potassium currents. Both effects generated intracellular calcium increases in astrocytes.

LISTA DE ABREVIATURAS

En orden alfabético:

[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio libre intracelular
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ctrl	Solución control
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
GABA	Ácido- γ -amino butírico
GFAP	Proteína ácido glío fibrilar
IC₅₀	Concentración que inhibe el 50% de la corriente
I-V	Relaciones corriente voltaje
K⁺	Potasio
K_A	Corrientes transitorias tipo "A"
K_{DR}	Corriente de potasio de rectificación tardía
K_{IR}	Corrientes de rectificación entrante
mec	Mecamilamina
NIC	Nicotina
O2A/OPC	Células precursoras de oligodendrocitos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos de sodio
R-nic	Receptores de acetilcolina tipo nicotínicos
RT-PCR	Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
TEA	Tetraetilamonio

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro.

Santiago Ramón y Cajal

La nicotina, además de ser el principal componente adictivo del tabaco, tiene efectos en procesos cognoscitivos como la atención, el aprendizaje y la memoria. También participa en ciertas patologías como las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer, la esquizofrenia, la depresión y la ansiedad. Todos estos efectos parecen ser mediados por la interacción de la nicotina con los receptores de acetilcolina nicotínicos en el sistema nervioso central (Le Houezec, 2003; Levin et al., 2006).

Los receptores nicotínicos son canales iónicos activados por ligando cuyo agonista endógeno es la acetilcolina. Estos receptores son proteínas de membrana pentaméricas compuestas por la combinación de distintas subunidades ($\alpha 2$ - $\alpha 10$ y $\beta 2$ - $\beta 4$) y están ampliamente distribuidos en el cerebro (Gotti et al., 2006). Cada subtipo de receptor nicotínico tiene propiedades biofísicas y farmacológicas que dependen de las subunidades que lo forman (Jensen et al., 2005; Le Novère et al., 2002). La activación de los receptores nicotínicos provoca la apertura del canal por donde fluyen los iones sodio, potasio y calcio, lo que genera una señal eléctrica en la célula blanco. Además, en presencia prolongada del agonista los receptores nicotínicos se desensibilizan (Jensen et al., 2005; Quick y Lester, 2002; Takeuchi, 1963). Las funciones de los receptores nicotínicos dependen de su distribución subcelular en las neuronas. Los receptores nicotínicos en la presinapsis modulan la liberación de neurotransmisores, en la postsinapsis participan en la transmisión excitadora rápida y fuera de la sinapsis influyen en la excitabilidad neuronal (Dani y Bertrand, 2007).

Interesantemente, la nicotina además de interactuar con los receptores nicotínicos también lo hace con algunos canales iónicos. La nicotina inhibe corrientes de potasio (corrientes de rectificación tardía, corrientes transitorias tipo “A” y corrientes de rectificación entrante) en miocitos ventriculares, células de músculo liso arterial y en sistemas de expresión heterólogos. En estos estudios la nicotina inhibió las corrientes de potasio por su interacción directa con los canales, sin la participación de los receptores nicotínicos (Tang et al., 1999; Wang et al., 1999a,b; 2000a,b).

Por otra parte, los astrocitos de la región CA1 del hipocampo expresan las subunidades de receptores nicotínicos $\alpha 3$ - $\alpha 5$, $\alpha 7$ y $\beta 4$ (Gahring et al., 2004a,b; Graham et al., 2003). Los reportes de respuestas generadas por nicotina en estas células gliales son pocos. Por ejemplo, la nicotina produce hiperpolarización, despolarización o ambos efectos en la membrana de astrocitos de cerebelo y médula espinal (Hösli et al., 1988). Además, en astrocitos corticales la nicotina aumenta la concentración de calcio intracelular, que es inhibida parcialmente por los antagonistas de receptores nicotínicos metilcaconitina y dihidro- β -eritroidina (Delbro et al., 2009; Oikawa et al., 2005). Aún cuando los astrocitos expresan canales iónicos, principalmente de potasio (Sontheimer y Waxman, 1993), al parecer no existen estudios acerca del efecto de la nicotina sobre estos canales. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue estudiar los dos posibles efectos de la nicotina, la activación de receptores nicotínicos y la inhibición directa de corrientes de potasio en astrocitos en cultivo de la región CA1 del hipocampo de rata. El objetivo fue abordado examinando dichos efectos sobre las corrientes de membrana y la concentración de calcio intracelular de los astrocitos.

CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES

It is a miracle that curiosity survives formal education.
Albert Einstein

I. NICOTINA

A. ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN Y ELIMINACIÓN DE LA NICOTINA

La nicotina, además de ser el principal componente adictivo del tabaco, también tiene efectos en procesos cognoscitivos, tanto en humanos como en animales de experimentación (Di Matteo et al., 2007; Levin et al., 2006). En humanos, fumadores y no fumadores, la nicotina mejora la atención (Kumari et al., 2003; Levin et al., 2001) y disminuye los errores en exámenes de memoria (McClernon et al., 2003).

La nicotina [3-(1-*metil-2-pirrolidinil*) piridina] constituye el 90% de los alcaloides de las hojas de tabaco (*Nicotinia tabaccum* y *Nicotinia rustica*) y de sus productos como cigarros, puros, rapé, parches y gomas de nicotina (Fejér-Kossey, 1967). Desde el punto de vista químico, la nicotina es una amina terciaria formada por un anillo de piridina y otro de metil-pirrolidina (Figura 1A). Se ha propuesto que el átomo de nitrógeno presente en el anillo de piridina y el grupo metilo del anillo de metil-pirrolidina son importantes para la unión y la afinidad de la nicotina al receptor de acetilcolina de tipo nicotínico (Glennon y Dukat, 2000).

La nicotina es una base débil, que cuando está a pH alcalino se encuentra principalmente no ionizada, estado que le permite atravesar fácilmente las membranas biológicas y ocurre lo contrario cuando está a pH ácido. Entonces, a pH fisiológico, ~69% de las moléculas de nicotina están ionizadas y ~31% no ionizadas (Adrian et al., 2006).

Con relación a los productos del tabaco, tales como puros, tabaco masticable, rapé, parches y gomas de nicotina, todos ellos tienen generalmente un pH alcalino, lo que facilita la absorción de la nicotina principalmente a través de la mucosa oral, y que llegue al cerebro gradualmente. En el caso de los cigarrillos de tabaco, éstos son una forma de administración de nicotina muy rápida y eficiente, aún cuando en éstos la nicotina tiene generalmente un pH ácido. Esto se debe a que el humo inhalado llega prácticamente a toda la superficie de las membranas alveolares, que están en contacto con muchos vasos sanguíneos cuyo flujo es alto, lo cual permite el paso rápido de la nicotina a la circulación sanguínea para llegar directamente al sistema nervioso central en pocos segundos, sin pasar por el hígado (Le Houezec, 2003).

Inmediatamente después de fumar un cigarrillo, la nicotina alcanza una concentración de ~300 nM tanto en la sangre arterial como en el cerebro, que decae en los siguientes 20 - 30 min. En cambio, la concentración que se alcanza en la sangre de las venas es ~10 veces menor que la alcanzada en el cerebro y las arterias, pero su decaimiento es más lento, ya que depende tanto de la distribución de la nicotina a otros órganos como de su eliminación (Figura 1B). Interesantemente, la nicotina absorbida a partir de un cigarrillo llega casi inmediatamente al sistema nervioso por lo que sus efectos se alcanzan muy rápido. En cambio, con otros medios de administración, la nicotina alcanza gradualmente el cerebro pero la exposición es más prolongada (Benowitz, 2008; Le Houezec, 2003).

Por otro lado, la nicotina es metabolizada en el hígado, principalmente por la enzima CYP2A6, que la convierte a cotinina y después a trans-3'-hidroxicotinina. Aun

cuando existen diferencias entre individuos, el tiempo medio de eliminación de la nicotina es de ~2 h (Le Houezec, 2003).

La concentración de nicotina en fumadores regulares oscila entre el consumo de un cigarro y otro. Por ejemplo, con cada cigarro la concentración de nicotina aumenta 30 - 180 nM, para llegar a un valor más o menos estable de 60 - 300 nM (Benowitz, 2008; Le Houezec, 2003).

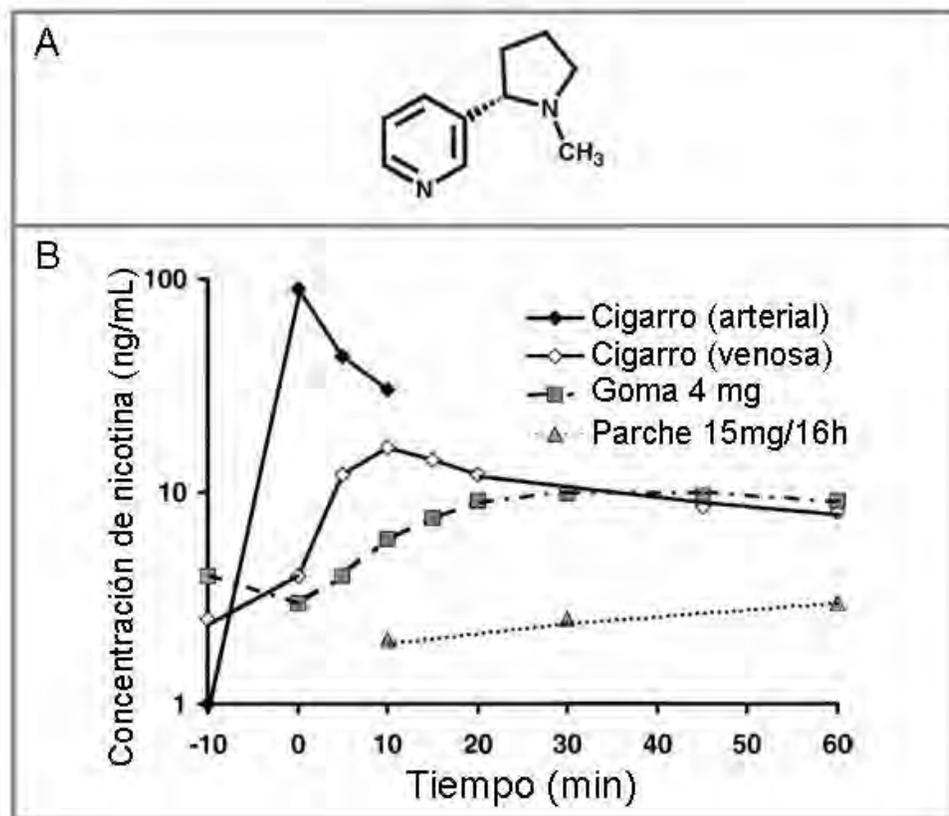


Figura 1. Concentración de nicotina en función del tiempo después del consumo de diversos productos de tabaco. (A) Estructura química de la molécula de nicotina. **(B)** Logaritmo de la concentración de nicotina en la sangre (venosa o arterial) después de consumir un cigarro, una goma de mascar de nicotina, o portar un parche de nicotina (tomado de Glennon y Dukat, 2000; Le Houezec, 2003).

B. RECEPTORES NICOTÍNICOS

En 1905, John Langley publicó un trabajo que inició con el estudio de los efectos de la nicotina en el sistema nervioso. La nicotina produjo respuestas en terminales nerviosas del sistema autónomo. Con base en sus observaciones, Langley propuso que las respuestas deberían estar mediadas por un receptor para la nicotina (Langley, 1905). A partir de entonces, existen numerosos estudios de los efectos de la nicotina como agonista de receptores nicotínicos, incluso se utiliza nicotina marcada radiactivamente para determinar la distribución de receptores nicotínicos en el sistema nervioso (Albuquerque et al., 2009).

Los receptores de acetilcolina de tipo nicotínico son proteínas de membrana formadas por cinco cadenas polipeptídicas (subunidades) arregladas alrededor de un poro central con su eje perpendicular a la membrana. En el sistema nervioso se han encontrado a la fecha 10 subunidades de receptores nicotínicos, nueve α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y tres β ($\beta 2$ - $\beta 4$). Con base en la unión de la α -bungarotoxina, los receptores nicotínicos se han dividido en dos subfamilias, los receptores que unen esta toxina (los homómeros de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ ó $\alpha 9$ y los heterómeros $\alpha 7\alpha 8$ y $\alpha 9\alpha 10$), y los receptores que no la unen (heterómeros formados por subunidades α y β). Además, las combinaciones de las distintas subunidades generan diferentes subtipos de receptores nicotínicos, cuyas características eléctricas, farmacológicas y cinéticas dependen de su composición (Jensen et al., 2005; Le Novère et al., 2002).

Cuando las moléculas de un agonista endógeno (acetilcolina, colina) o exógeno (nicotina, epibatidina, citisina, etc.) se unen al receptor nicotínico, provoca la apertura del canal por donde fluyen los iones sodio, potasio y calcio, lo que genera una señal

eléctrica en la célula blanco. En presencia prolongada del agonista los receptores se desensibilizan (Jensen et al., 2005; Quick y Lester, 2002; Takeuchi, 1963). La corriente transmembranal generada por la activación de la mayoría de los subtipos de receptores nicotínicos tiene una rectificación entrante. Esto se ha encontrado en neuronas ganglionares (Mathie et al., 1990), en neuronas hipocampales (Alkondon y Albuquerque, 1993), en receptores $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 4\beta 4$ expresados en células HEK293 (Chávez-Noriega et al., 2000), y en otros tipos celulares. La rectificación entrante de los receptores nicotínicos significa que hay flujo iónico cuando la membrana celular está hiperpolarizada, pero conforme el potencial de la membrana cambia hacia voltajes más positivos, este flujo disminuye gradualmente.

C. CAMBIOS DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR POR NICOTINA

La activación de los receptores nicotínicos, además de generar un cambio rápido del potencial de membrana, también aumenta la concentración de calcio libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y así contribuye a la señalización intracelular con una variedad de consecuencias funcionales (McKay et al., 2007). Esto se debe en parte a la permeabilidad de los receptores nicotínicos para calcio y cada subtipo tiene una permeabilidad a este catión que depende de las subunidades que lo constituyen (Fucile, 2004). La permeabilidad de los receptores para calcio se puede obtener con registros simultáneos, tanto de la corriente transmembranal como de la $[Ca^{2+}]_i$. Con la relación entre ambas medidas se obtiene el porcentaje de la corriente total que es llevada por los iones calcio, que corresponde a la fracción de la corriente de calcio (Neher, 1995).

Esta fracción es de 1.5 - 4.6% para los receptores nicotínicos heteroméricos y de 8.8 - 11.4% para los receptores homoméricos (Fucile, 2004). Existen al menos tres mecanismos por los que los receptores nicotínicos generan aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ y que además pueden ser complementarios: a) por la entrada de calcio a través del canal del receptor, b) por la apertura de canales de calcio activados por voltaje, debido a la despolarización producida por la activación de los receptores y c) liberación de calcio de reservorios intracelulares generada por la entrada de calcio a través de canales iónicos (receptores nicotínicos y/o canales de calcio activados por voltaje) (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004). Así, la nicotina aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ en neuronas y en otros tipos celulares. Por ejemplo, en neuronas hipocámpales en cultivo lo hace mediante receptores $\alpha 7$ y canales de calcio activados por voltaje (Barrantes et al., 1995). En neuronas en cultivo del ganglio vago, tanto la nicotina como el yoduro de dimetil-4-fenilpiperazonio, agonista de receptores nicotínicos ganglionares, aumentan la $[Ca^{2+}]_i$, (Xu et al., 2007). Asimismo, en células SH-SY5Y, contribuyen para el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ la activación por nicotina de los receptores nicotínicos $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 7$, los canales de calcio activados por voltaje, y el calcio liberado de reservorios intracelulares (Dajas-Bailador et al., 2002). Finalmente, en células de la médula adrenal el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ por nicotina es inhibido por la d-tubocurarina, antagonista de receptores nicotínicos (Afar et al., 1994).

D. DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES NICOTÍNICOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

En el cerebro de roedores, las subunidades de receptores nicotínicos más ampliamente distribuidas son $\alpha 4$, $\alpha 7$ y $\beta 2$ y los subtipos de receptores nicotínicos más abundantes son los $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$. Así, el receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ tiene una expresión alta en corteza, estriado, colículo superior, núcleo geniculado lateral y cerebelo; mientras que los receptores nicotínicos que contienen la subunidad $\alpha 7$ tienen una expresión alta en corteza, hipocampo y regiones límbicas subcorticales, y una expresión baja en áreas talámicas y ganglios basales. Por otro lado, los receptores que contienen las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 3$ o $\beta 4$ tienen una distribución limitada a algunas áreas del cerebro o grupos celulares (Figura 2; Gotti et al., 2006).

En las neuronas, los receptores nicotínicos se encuentran en distintas regiones (soma, dendritas o axones), pueden estar muy cerca de la sinapsis (perisinapsis), en la zona presináptica o en la postsináptica (Fabian-Fine et al., 2001; Lendvai y Vizi, 2008). Esta distribución subcelular es muy importante porque determina, en gran medida, el papel fisiológico de los receptores nicotínicos en los sistemas neuronales. Por ejemplo, los receptores nicotínicos postsinápticos participan en la transmisión excitadora rápida en neuronas piramidales de la neocorteza y en interneuronas de la región CA1 de hipocampo (Alkondon et al., 1998; Chu et al., 2000). Por otro lado, los receptores nicotínicos presinápticos modulan la liberación de varios neurotransmisores que incluyen al ácido- γ -amino butírico (GABA), glutamato, dopamina, norepinefrina, serotonina, y acetilcolina (Dorostkar y Boehm, 2008; Lendvai y Vizi, 2008; Wonnacott, 1997). Por su parte, los receptores nicotínicos no-sinápticos modulan la excitabilidad de

las neuronas. Por ejemplo, algunas neuronas GABAérgicas y colinérgicas de la banda diagonal septal son despolarizadas como consecuencia de la activación de receptores nicotínicos, localizados en su soma y/o dendritas, y esto contribuye a alcanzar el umbral necesario y disparar un potencial de acción (Henderson et al., 2005).

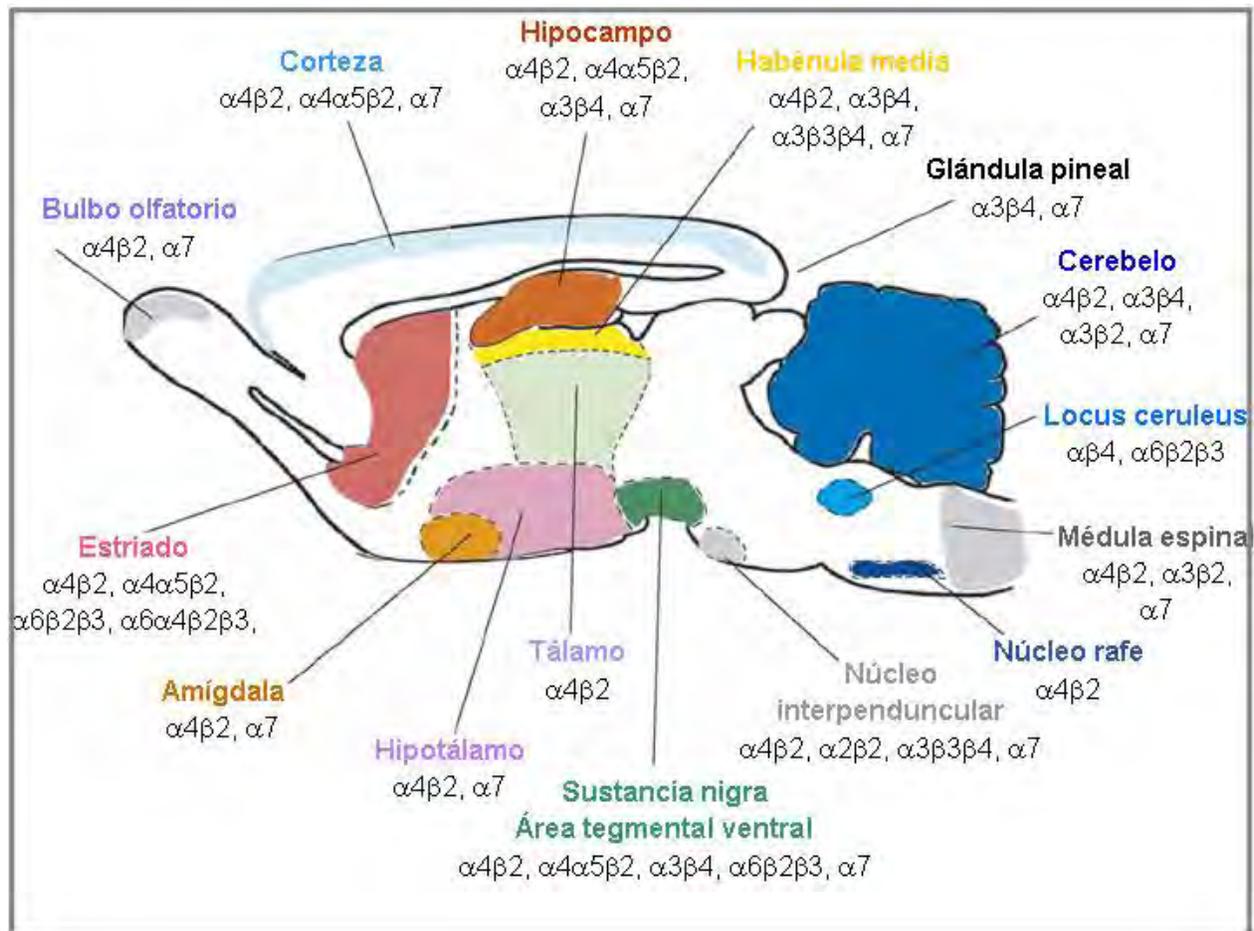


Figura 2. Distribución de los receptores nicotínicos. Esquema del sistema nervioso central de roedor, en donde se ilustra la distribución de los principales subtipos de receptores nicotínicos (tomado de Gotti et al., 2006).

E. EFECTOS DE LA NICOTINA EN CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR VOLTAJE

La nicotina, además de interactuar con los receptores nicotínicos, también lo hace con algunos canales iónicos. Este último caso está poco estudiado y se ha documentado principalmente en canales de potasio.

El primer estudio de que la nicotina inhibe una corriente de potasio fue en neuronas estriatales. En este caso, el efecto inhibitor de la nicotina ocurre por la activación de receptores nicotínicos, ya que la dihidro- β -eritroidina (antagonista de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$) impide tal inhibición, y algunos agonistas de receptores nicotínicos reproducen la inhibición de la corriente de potasio (Hamon et al., 1997). Por otro lado, la nicotina tiene un efecto contrario sobre la corriente de potasio en células de músculo liso vascular. Entre 1 y 10 μM de nicotina, la corriente de potasio aumenta por un mecanismo que depende de la activación de receptores nicotínicos; en cambio, entre 0.3 y 3 mM de nicotina, la corriente de potasio disminuye por la acción directa de la nicotina sobre los canales (Tang et al., 1999).

En otros casos, la nicotina tiene únicamente un efecto inhibitor sobre las corrientes de potasio, aún en presencia de antagonistas de receptores nicotínicos. Por ejemplo, en miocitos cardiacos, la nicotina inhibe la corriente de potasio transitoria, con una concentración que inhibe el 50% de la corriente (IC_{50}) de $0.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ a 0 mV, la corriente de potasio de rectificación tardía con una IC_{50} de $1.3 \pm 0.5 \mu\text{M}$ a 0 mV, y la corriente de potasio de rectificación entrante con una IC_{50} de $4 \pm 0.4 \mu\text{M}$ a -100 mV. Asimismo, la nicotina también tiene un efecto inhibitor en los canales de potasio Kir2.1,

Kir2.2, Kv4.2, Kv4.3 y HERG, expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* (Wang et al., 1999a,b; 2000a,b).

Se sabe poco acerca de los mecanismos por los cuales la nicotina inhibe canales de potasio. Así, la nicotina inhibe los canales HERG, principalmente por su unión a los canales en estado inactivo. En estos canales, la nicotina produce cambios en la curva de inactivación, como la constante de tiempo de inactivación, mientras que prácticamente no cambia la curva de activación (Wang et al., 1999b).

II. EFECTOS DE LA NICOTINA EN EL HIPOCAMPO

A. ESTRUCTURA DEL HIPOCAMPO, NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES

El hipocampo es una estructura límbica cortical que recibe fibras aferentes de áreas corticales a través de la corteza entorrinal. También recibe aferencias colinérgicas, dopaminérgicas, y noradrenérgicas (a través de la vía fimbria-fórnix) que vienen del septum, de la banda diagonal de Broca, del hipotálamo y de los núcleos de la formación reticular (Amaral y Witter, 1989).

El hipocampo, junto con el giro dentado, el complejo subicular (compuesto por presubiculum, subiculum y parasubiculum), y la corteza entorrinal constituyen la formación hipocampal. El hipocampo, a su vez, se divide en tres regiones CA1, CA2 y CA3 (Figura 3). La región CA1 se caracteriza por estar formada de células piramidales pequeñas; mientras que CA2 y CA3 tienen células piramidales de mayor tamaño (Ishizuka et al., 1995). En las regiones del hipocampo se encuentran diferentes capas: el *stratum alveus*, *stratum oriens*, *stratum radiatum*, *stratum lacunosum-moleculare* y la

capa piramidal. En la región CA3 se encuentra una capa adicional, el *stratum lucidum* (Amaral y Witter, 1989).

Con relación al circuito neuronal de la formación hipocampal, denominado “circuito trisináptico”, las distintas regiones están conectadas de forma unidireccional a través de las células piramidales (CA1-CA3) y las células granulares del giro dentado. El circuito inicia con las neuronas de la corteza entorrinal, que envían sus aferencias al giro dentado, formando así la vía perforante. De las células granulares del giro dentado salen proyecciones hacia la región CA3, llamadas fibras musgosas. Las células piramidales de CA3 emiten sus axones, que conforman las colaterales de Schaffer, hacia las dendritas apicales de las células piramidales de la región CA1 (Figura 3). Finalmente, las células de esta región envían la mayoría de sus proyecciones hacia el subiculum y la corteza entorrinal (Naber et al., 2000).

En el hipocampo, además de las células piramidales y granulares, existe una variedad de interneuronas, la mayoría de naturaleza GABAérgica. La clasificación de las interneuronas es compleja porque tienen proyecciones dendríticas y axónicas diversas, están asociadas a nivel pre y postsináptico con diferentes tipos de células, y también tienen distintas propiedades inmunohistoquímicas y electrofisiológicas. Con base en sus características morfológicas, es decir, la forma de su axón o de sus ramificaciones dendríticas, las interneuronas se han clasificado en células en canasta, células horizontales y células estrelladas. O bien, en células axo-axónicas, axo-somáticas y axo-dendríticas, considerando la región subcelular con la que hacen contacto en su blanco. También se clasifican en células *lacunosum*-molecular, células biestratificadas *oriens-oriens*, células piramidal-*lacunosum* molecular de acuerdo a la ubicación de su soma, axones y dendritas en las diferentes capas (Maccaferri y

Lacaille, 2003). Por otro lado, para clasificar las interneuronas se pueden utilizar varias características a la vez como: a) morfología, b) la expresión de algún péptido (somatostatina, colecistocinina y sustancia P) o alguna proteína que une el calcio (calbindina, parvalbúmina y calretinina), y c) características electrofisiológicas. Por ejemplo, la mayoría de las células en canasta expresan parvalbúmina y se caracterizan electrofisiológicamente, con respecto a otros grupos neuronales, por tener potenciales despolarizantes repetitivos por activación sináptica y sus potenciales de acción son cortos. Asimismo, las interneuronas que expresan calbindina tienen el umbral de disparo bajo y un amplio espectro para adaptar la frecuencia de disparo (Benes y Berretta, 2001; Kullmann y Lamsa, 2007).

Por otra parte, en el hipocampo también existen diferentes tipos de células gliales como precursores de oligodendrocitos (Chen et al., 2008), oligodendrocitos (Berger y Frotscher, 1994), microglía (Eyüpoglu et al., 2003) y astrocitos (Bushong et al., 2002; Catalani et al., 2002; Conejo et al., 2003; Ventura y Harris, 1999). Las células gliales ocupan aproximadamente el 50% del volumen total del cerebro de vertebrados, y de éstas, los astrocitos son el tipo más abundante (Laming et al., 2000).

Los astrocitos tienen un soma de forma irregular, que mide entre 7-9 μm , y de éste salen numerosas arborizaciones que se ramifican extensamente (Bushong et al., 2002). La distribución de los astrocitos en el cerebro se ha examinado principalmente marcando la proteína ácido glío fibrilar (GFAP, por sus siglas en inglés), la cual forma un filamento intermedio expresado exclusivamente por los astrocitos (Eng, 1985).

En el hipocampo, la morfología y el número de astrocitos es similar cuando se comparan las regiones CA1 y CA3 (Catalani et al., 2002). En cambio, el número de

astrocitos es diferente entre hembras y machos en ratas adultas. Éstos últimos tienen más astrocitos en la región CA3, mientras que las hembras tienen más astrocitos en la región CA1 (Conejo et al., 2003). Además, los astrocitos se encuentran muy cercanos a las neuronas, envolviendo a la mayoría de las sinapsis (Ventura y Harris, 1999).

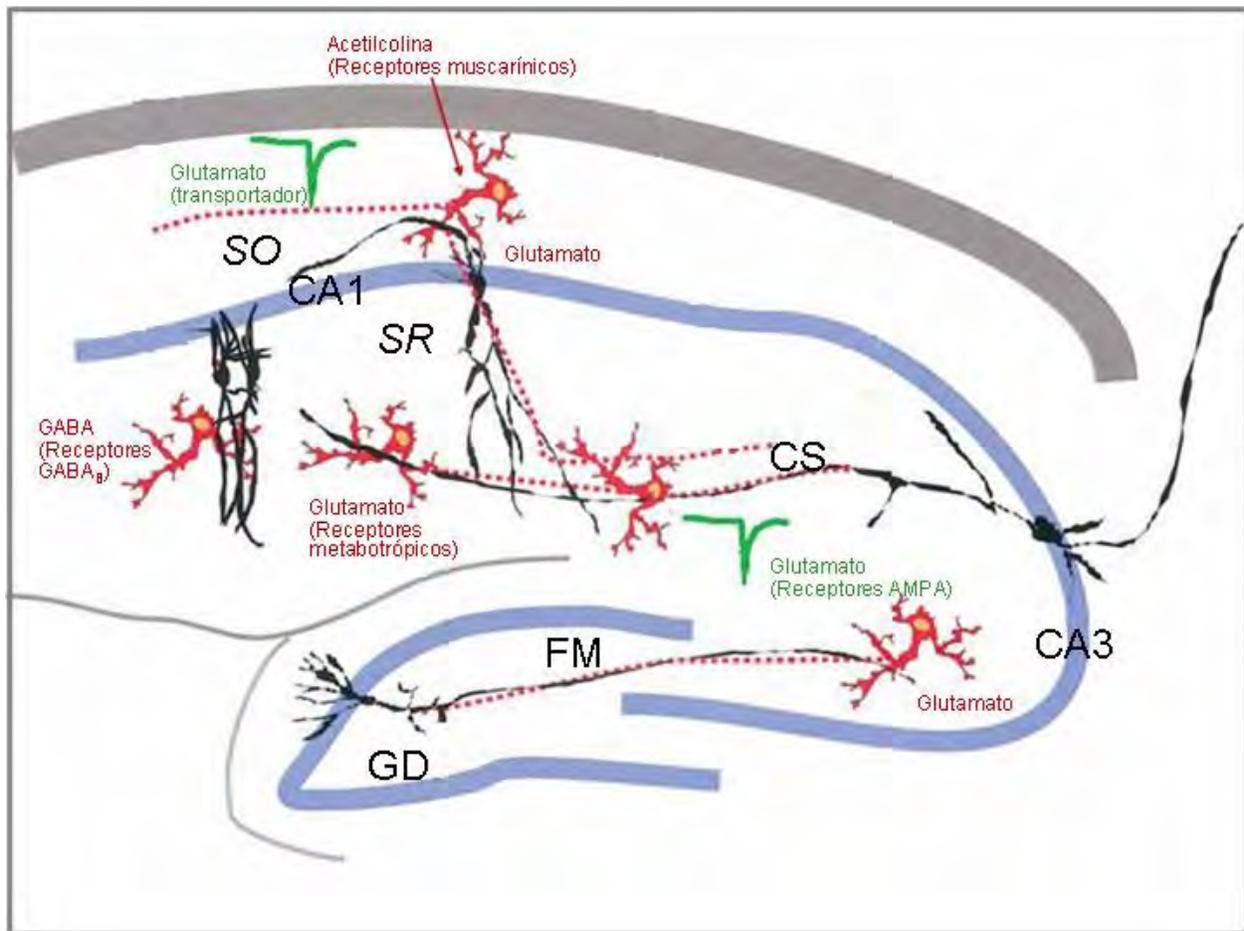


Figura 3. Esquema de la formación hipocampal de rata y respuestas generadas en astrocitos por actividad neuronal. Dibujo de la formación hipocampal donde se indica: el giro dentado (GD) y la proyección de sus células granulares, las fibras musgosas (FM); la región CA3 y sus aferencias, las colaterales de Schaffer (CS); y la región CA1. En esta última, se señalan las capas: *stratum oriens* (SO) y *stratum radiatum* (SR). Las células granulares y piramidales están representadas con la línea azul. Por otra parte, se representan los astrocitos, de las diferentes regiones del hipocampo, que responden a la actividad sináptica. Los neurotransmisores que actúan en los receptores de los astrocitos generando aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ se señalan con rojo; mientras que los que participan en la generación de corrientes iónicas de membrana se indican con verde (tomado de Schipke y Kettenmann, 2004).

B. RECEPTORES NICOTÍNICOS Y EFECTOS DE LA NICOTINA EN NEURONAS DE HIPOCAMPO

Los receptores nicotínicos tienen una distribución muy amplia en el hipocampo de humano, mono y roedor. El ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 7$ y $\beta 2$ - $\beta 4$ de receptores nicotínicos se ha encontrado en la mayoría de células piramidales, granulares e interneuronas de todas las regiones del hipocampo (Séguéla et al., 1993; Sheffield et al., 2000; Sudweeks y Yakel, 2000; Rubboli et al., 1994). De manera consistente, usando anticuerpos dirigidos contra cada una de las subunidades de receptores nicotínicos, también se han encontrado las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$ en las neuronas de hipocampo. Además, en las fibras aferentes colinérgicas, provenientes del septum medial y de la banda diagonal, se encuentran las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\beta 4$ de receptores nicotínicos (Gahring et al., 2004a,b; Graham et al., 2003).

Por otro lado, la nicotina produce diferentes efectos en las neuronas de hipocampo, las despolariza, desensibiliza los propios receptores nicotínicos, cambia la $[Ca^{2+}]_i$ y también puede modificar la actividad sináptica.

En las interneuronas del *stratum radiatum* de la región CA1 de hipocampo, la nicotina, aplicada por tiempos relativamente breves (6-60 s), facilita la generación de potenciales de acción debido a la activación de receptores nicotínicos $\alpha 7$; mientras que la nicotina aplicada por tiempos más prolongados (10-15 min) inhibe las corrientes iónicas mediadas por el receptor nicotínico $\alpha 7$, debido a la desensibilización de estos receptores. Algo similar sucede en las interneuronas del *stratum lacunosum-moleculare*, pero en estas participan los receptores $\alpha 4\beta 2$ (Alkondon et al., 2000).

También la nicotina genera aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ en neuronas hipocampales (Barrantes et al., 1995) y en regiones subcelulares específicas de estas neuronas como en las fibras musgosas de la región CA3 y en las dendritas de interneuronas del *stratum radiatum* y de las neuronas piramidales de la región CA1 de hipocampo (Sharma y Vijayarhagavan, 2003; Szabo et al., 2008a, b).

Otro efecto importante de la nicotina es la capacidad de modificar la transmisión sináptica. En el giro dentado y en la región CA1 del hipocampo, la activación de receptores nicotínicos $\alpha 7$ por la nicotina facilita la potenciación de larga duración (Nakauchi et al., 2007; Welsby et al., 2006). Asimismo, la nicotina produce este efecto aún cuando se encuentre alterada la transmisión sináptica. Por ejemplo, en el hipocampo, cuando se aplica saponina-192-IgG, que es un tóxico colinérgico que altera la transmisión sináptica, la nicotina facilita la potenciación de larga duración (Yamazaki et al., 2002).

III. ASTROCITOS DE HIPOCAMPO

A. FUNCIONES DE LOS ASTROCITOS, MODULACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA

En el sistema nervioso central, los astrocitos cumplen numerosas funciones importantes. Una de ellas es proporcionar nutrientes a las neuronas en forma de lactato, que es su principal fuente de energía (Yamate et al., 1997). Los astrocitos también participan en la captura de neurotransmisores liberados por las terminales nerviosas, mediante transportadores específicos para neurotransmisores como el

GABA, glicina y glutamato (Marcaggi y Attwell, 2004). Otro papel de los astrocitos es su participación en la transmisión sináptica, debido a que existe una comunicación recíproca con las neuronas, es decir, las neuronas envían señales a los astrocitos y a su vez, los astrocitos envían señales a las neuronas.

Los neurotransmisores que son liberados por las neuronas pueden alcanzar y generar respuestas en los astrocitos. Por ejemplo, en el giro dentado se observó por primera vez que la estimulación de las neuronas genera aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos (Dani et al., 1992). A partir de entonces, se ha descubierto en otras regiones del hipocampo y en otras estructuras del cerebro que la actividad neuronal tiene un efecto directo sobre los astrocitos, produciendo cambios de la corriente de membrana y/o de la $[Ca^{2+}]_i$ (Grosche et al., 1999; Newman, 2004; Perea y Araque, 2005). Las respuestas de los astrocitos están mediadas principalmente por la activación de receptores para los neurotransmisores liberados por las neuronas. En los astrocitos se han descubierto receptores prácticamente para todos los neurotransmisores (Schipke y Kettenmann, 2004), particularmente en el hipocampo expresan receptores purinérgicos (Fellin et al., 2006a), receptores para GABA ionotrópicos y metabotrópicos (Meier et al., 2008), receptores para glutamato ionotrópicos y metabotrópicos (Matthias et al., 2003; Schipke y Kettenmann, 2004), receptores nicotínicos (Sharma y Vijayaraghavan, 2001), entre otros (Figura 3).

De manera interesante, la respuesta de los astrocitos consiste en cambios de su $[Ca^{2+}]_i$, que trae como consecuencia fisiológica la liberación de transmisores (glutamato, trifosfato de adenosina ó D-serina), que a su vez inciden directamente en los receptores

neuronales, modulando así la transmisión sináptica (Fellin et al., 2006b; Halassa et al., 2007; Jourdain et al., 2007; Miller, 2004; Perea y Araque, 2007).

B. RECEPTORES NICOTÍNICOS EN CÉLULAS GLIALES

La información acerca de los receptores nicotínicos en células gliales del sistema nervioso central es limitada. Los primeros hallazgos fueron obtenidos en astrocitos de cerebelo y de médula espinal que unían [³H]-nicotina y [³H]-acetilcolina, esta última en presencia de antagonistas de receptores muscarínicos (Hösli y Hösli, 1988). La expresión de receptores nicotínicos en astrocitos fue confirmada con ensayos inmunohistoquímicos. El anticuerpo W6, que reconoce estos receptores se unió a algunos de los astrocitos de cerebelo, hipocampo, corteza y área preóptica (Hösli y Hösli, 2000). Estudios más recientes, utilizando análisis de transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés), han descubierto el ARNm que codifica para las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\beta 2$ - $\beta 4$ de receptores nicotínicos en astrocitos de corteza (Oikawa et al., 2005), las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 3$ en astrocitos de hipocampo (Xiu et al., 2005), las subunidades $\alpha 3$ - $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$ en células precursoras de oligodendrocitos de cuerpo calloso (O2A/OPC, A2B5⁺; Rogers et al., 2001) y la subunidad $\alpha 7$ en células microgliales corticales (Shytle et al., 2004). En este sentido, con pruebas que detectan proteínas, también se ha encontrado la expresión de las subunidades $\alpha 3$ - $\alpha 5$, $\alpha 7$ y $\beta 4$ en astrocitos de la región CA1 de hipocampo (Gahring et al., 2004, b; Graham et al., 2003) y $\alpha 7$ en astrocitos del órgano subfornical (Ono et al., 2008).

Lo anterior sugiere que hay una distribución relativamente amplia de subunidades de receptores nicotínicos en las células gliales. Sin embargo, son pocos los estudios funcionales en estas células, en donde se muestren respuestas eléctricas y/o variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$, mediadas por receptores nicotínicos. Los primeros reportes de respuestas mediadas por receptores nicotínicos en células gliales fueron obtenidos en células de Schwann de calamar. La nicotina generó una hiperpolarización de la membrana de estas células, respuesta inhibida por α -bungarotoxina, antagonista de receptores nicotínicos (Villegas, 1975). Además, en la mayoría de astrocitos de cerebelo y de médula espinal la nicotina produjo hiperpolarización de la membrana; en un número menor de astrocitos la nicotina generó despolarización y en otro grupo pequeño hubo respuestas combinadas, es decir despolarización seguida de una hiperpolarización. Todas estas respuestas fueron inhibidas por mecamilamina, antagonista de receptores nicotínicos de espectro amplio (Hösli et al., 1988). Asimismo, en astrocitos de hipocampo, la activación de los receptores nicotínicos con acetilcolina generó tanto una corriente entrante a través de la membrana como un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, cuya farmacología sugiere que ambos eventos son mediados por receptores nicotínicos $\alpha 7$ (Sharma y Vijayaraghavan, 2001). Por otro lado, la nicotina también produjo variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos de corteza, que fueron inhibidas parcialmente por antagonistas selectivos de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ (Delbro et al., 2009; Oikawa et al., 2005). Además, en las células O2A/OPC A2B5⁺, la nicotina generó aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$, debido a la activación de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$, en donde también los canales de calcio activados por voltaje participan de manera importante (Rogers, et al., 2001). Asimismo, la acetilcolina y la colina generaron, en

células gliales NG2, corrientes iónicas entrantes y aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ por la activación de receptores nicotínicos $\alpha 7$ (Vélez-Fort et al., 2009). A la fecha, existe sólo un reporte en donde, en porciones de células gliales aisladas de corteza, llamados gliosomas, la activación de receptores nicotínicos $\alpha 7$ generó aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y condujo a la liberación de glutamato (Patti et al., 2007).

C. CANALES DE POTASIO EN ASTROCITOS DE HIPOCAMPO

En los astrocitos se han encontrado al menos tres corrientes de potasio activadas por voltaje, corrientes de rectificación tardía (K_{DR}), corrientes transitorias tipo "A" (K_A) y corrientes de rectificación entrante (K_{IR}). De estas, el primer y segundo tipo dan lugar a corrientes de potasio salientes, mientras que la última origina corrientes de potasio entrantes (Sontheimer y Waxman, 1993).

En los astrocitos se han encontrado dos subunidades que pueden originar la corriente K_{DR} , la subunidad Kv1.6 en corteza cerebral y la Kv1.5 en hipocampo, cerebelo y médula espinal (Smart et al., 1997; Roy et al., 1996). La función de la corriente K_{DR} en los astrocitos es poco conocida, pero se sabe que en células microgliales activadas por un lipopolisacárido, la K_{DR} podría contribuir de manera importante a establecer el potencial de la membrana en reposo (Chung et al., 1998). Además, cuando se evita la expresión de la proteína Kv1.5 en astrocitos de médula espinal, se inhibe su proliferación (MacFarlane y Sontheimer, 2000).

Por otra parte, en astrocitos se ha identificado el ARNm para 15 de las 16 subunidades que originan la corriente K_{IR} (Olsen et al., 2008). Se ha propuesto que la corriente K_{IR} tiene funciones muy importantes en los astrocitos como permitir una

permeabilidad alta a potasio, mantener el potencial de membrana en potenciales muy negativos, y regular la concentración de potasio extracelular, contribuyendo en general a la homeostasis de este catión en el cerebro (Butt y Kalsi, 2006).

Además, también se han descubierto en astrocitos las tres subunidades que pueden originar la corriente K_A y de éstas la $Kv4$ es la que principalmente se expresa (Bekar et al., 2005). En las neuronas la corriente K_A cumple papeles muy importantes como controlar su excitabilidad, la liberación de neurotransmisores y también modular la frecuencia de disparo (Cai et al., 2007). En los astrocitos la función de la corriente K_A es menos conocida, se ha propuesto que participa en la respuesta del astrocito con oscilaciones del potencial de membrana cuando hay actividad neuronal de alta frecuencia, sincronizando en cierta forma la actividad entre ambos tipos celulares (Bekar et al., 2005).

CAPÍTULO 3: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

"We can't solve problems by using the same kind of thinking we used when we created them."
Albert Einstein.

Si bien hay numerosos estudios acerca del efecto de la nicotina como agonista de receptores nicotínicos (Alkondon et al., 2009; McKay et al., 2007) y éstos tienen una distribución amplia en las neuronas del sistema nervioso (Gotti et al., 2006), también se ha encontrado, principalmente en células cardíacas, que la nicotina puede inhibir directamente algunos canales de potasio (Tang et al., 1999; Wang et al., 1999a,b; 2000a,b).

Los astrocitos de la región CA1 de hipocampo tienen diferentes canales iónicos, activados por ligando o voltaje. De nuestro particular interés, los astrocitos de esta región expresan las subunidades de receptores nicotínicos $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ y $\beta 4$ (Gahring et al., 2004, b; Graham et al., 2003) y de las corrientes iónicas activadas por voltaje, principalmente las de potasio tipo K_{DR} , K_A y K_{IR} (Sontheimer y Waxman, 1993).

A la fecha, se ha reportado que la nicotina produce en astrocitos hiperpolarización y depolarización de la membrana (Hösli et al., 1988), aumento de la concentración de calcio intracelular (Delbro et al., 2009; Oikawa et al., 2005) y liberación de glutamato (Patti et al., 2007). Con estos estudios han encontrado que la nicotina activa receptores nicotínicos en los astrocitos, generando las respuestas observadas; sin embargo, al parecer no se ha explorado la posibilidad de que en estas células la nicotina inhiba algún canal iónico activado por voltaje.

En este sentido, considerando que los astrocitos de la región CA1 de hipocampo expresan receptores nicotínicos y canales de potasio, en esta tesis se estudiaron los

dos efectos de la nicotina: la activación de receptores nicotínicos y la inhibición directa de corrientes de potasio. Además, se evaluó el efecto de ambos mecanismos en la concentración de calcio intracelular de los astrocitos. Finalmente, se examinó el efecto sobre corrientes de potasio con aplicaciones prolongadas de nicotina a la concentración que podría encontrarse en el sistema nervioso de un fumador.

CAPÍTULO 4: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

De noche, el mar y el cielo son uno solo y hasta la tierra se confunde con la oscura inmensidad que lo envuelve todo. No hay resquicios. No hay cortes. No hay separaciones. La noche es la mejor representación de la infinitud del universo. Nos hace creer que nada tiene principio y nada, fin.

Carlos Fuentes

I. HIPÓTESIS

1. En astrocitos de la región CA1 de hipocampo, la nicotina produce efectos opuestos en la corriente transmembranal. Cuando actúa sobre receptores nicotínicos aumenta la conductancia de la membrana mientras que cuando actúa sobre canales de potasio disminuye la conductancia de la membrana.

2. En astrocitos de la región CA1 de hipocampo, el efecto de la nicotina sobre receptores nicotínicos y canales de potasio resulta en el aumento de la concentración de calcio libre intracelular.

II. OBJETIVO GENERAL

En astrocitos en cultivo de la región CA1 de hipocampo, estudiar las respuestas, eléctricas y variaciones de la concentración de calcio intracelular, generadas por nicotina.

III. OBJETIVOS PARTICULARES

I. Registros eléctricos en astrocitos en cultivo de la región CA1 de hipocampo.

1. Durante las respuestas generadas por nicotina, estudiar los cambios de la conductancia de la membrana.

2. Con estrategias farmacológicas, estudiar las respuestas mediadas por la activación de receptores nicotínicos.

3. Utilizando antagonistas de receptores nicotínicos, examinar el efecto inhibitorio que tiene la nicotina directamente sobre las corrientes iónicas. De estas, identificar la corriente principal que es inhibida por nicotina. En la corriente afectada por nicotina, examinar su efecto con concentraciones bajas y aplicaciones prolongadas.

II. Registros de la concentración de calcio intracelular en astrocitos en cultivo de la región CA1 de hipocampo.

1. Estudiar las variaciones de la concentración de calcio intracelular generadas por nicotina.

2. Utilizando agonistas nicotínicos, estudiar las respuestas mediadas por la activación de receptores nicotínicos.
3. Examinar el efecto de la nicotina sobre la concentración de calcio intracelular cuando inhibe corrientes iónicas.

CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS

Every day I remind myself that my inner and outer life are based on the labors of other men, living and dead, and that I must exert myself in order to give in the same measure as I have received and am still receiving.
Albert Einstein

I. CULTIVO DE ASTROCITOS DE LA REGIÓN CA1 DE HIPOCAMPO

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las normas éticas de la Universidad Nacional Autónoma de México para el uso, cuidado y mantenimiento de animales de laboratorio. Para cada cultivo celular, dos ratas Wistar macho recién nacidas se sacrificaron por decapitación. Se obtuvieron los cerebros y se colocaron inmediatamente en una caja de Petri de 35 mm que contenía 2 mL de solución control fría (ver la sección Registros electrofisiológicos). Después, los cerebros se transfirieron, uno a la vez, a la parte superior de una caja de Petri de 10 cm con hielo en su interior para mantener la temperatura cercana a 0°C, cuidando de mantener el cerebro embebido con la solución control todo el tiempo. Utilizando una navaja del número 11 (Becton Dickinson AcuteCare, New Jersey, USA), se realizó un corte coronal que corresponde aproximadamente a la coordenada interaural 4.64 mm y otro en la 6.48 mm del atlas de Paxinos y Watson (2005), para obtener una rebanada que contuviera el hipocampo. Posteriormente, observando la rebanada de cerebro con ayuda de un microscopio estereoscópico (Stemi 1000, Carl Zeiss, Inc.) se identificó el hipocampo en ambos hemisferios. De cada hemisferio se obtuvo la región CA1 del hipocampo usando pinzas y tijeras de disección, cuidando de no contaminar con vasos sanguíneos y con las otras regiones del hipocampo, como CA3 y el giro dentado. La región CA1 del hipocampo se transfirió a una caja de Petri de 35 mm, que contenía 2 mL de solución control fría, en donde se cortó en pedazos pequeños con ayuda de pinzas y tijeras. Con

una pipeta de 1 mL (Pipettman, Gilson, France), las piezas de tejido se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1 mL que contenía 700 μ L de medio de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagles Medium” (DMEM, por sus siglas en inglés) adicionado con 10% suero bovino fetal, 11 mg/mL piruvato de sodio, 100 unidades/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina. A continuación, el tejido se hizo pasar, al menos tres veces, a través de la punta de una pipeta Pasteur para disociar mecánicamente las células. La pipeta Pasteur previamente fue estirada y pulida con fuego, así como tratada con Sigmacote (Sigma, MO, USA) para evitar la adhesión del tejido a sus paredes. La suspensión de células se observó con un microscopio (Olympus IX-70, Japan) utilizando un objetivo de 40x y apertura numérica de 0.55 (Olympus LCAch, Japan), ajustando la densidad a ~5000 células/mL. A continuación, 300 μ L de la suspensión de las células se colocó en un cubreobjeto, previamente tratado con 0.01% de poli-L-ornitina, dentro de una caja de Petri de 35 mm. Después, se agregaron 2 mL de medio DMEM, adicionado con los suplementos mencionados arriba. Para seleccionar en los cultivos celulares únicamente a los astrocitos, después de 24 horas de cultivo, el medio DMEM se reemplazó con 2 mL del medio de cultivo neurobasal, libre de suero, adicionado con el suplemento G5, 2 mM de glutamina, 100 unidades/mL de penicilina, y 100 μ g/mL de estreptomina. El suplemento G5 (compuesto por transferrina humana 500 μ g/mL, selenio 0.52 μ g/mL, insulina 5 mg/mL, biotina 100 μ g/mL, hidrocortisona 0.36 μ g/mL, factor de crecimiento fibroblástico 0.50 μ g/mL y factor de crecimiento epidermal 0.10 μ g/mL) permite que las células obtenidas en cultivo sean únicamente astrocitos (Bottenstein, 1988). Lo anterior fue confirmado con ensayos inmunocitoquímicos descritos en la siguiente sección. Los

cultivos se mantuvieron en una incubadora en condiciones controladas de humedad, a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada cuatro días.

Todo el procedimiento descrito se realizó en condiciones estériles. Las soluciones utilizadas se esterilizaron usando filtros con poros de 0.22 µm (Millipore, Ireland). Todos los reactivos utilizados en esta sección se obtuvieron de Gibco BRL, Carlsbad, CA.

II. ENSAYOS INMUNOCITOQUÍMICOS PARA IDENTIFICAR ASTROCITOS

Los cubreobjetos que contenían las células, entre 4 y 7 días de cultivo, se lavaron dos veces con 0.1 M de solución amortiguadora de fosfatos de sodio (PBS, por sus siglas en inglés) que contenía (en mM) NaCl 137, KCl 2.7, NaH₂PO₄ 1.4, Na₂HPO₄ 4.3, pH 7.4. Todos los periodos de lavado con PBS fueron por 10 min. Después, las células fueron fijadas incubándolas con metanol al 100% a -20°C por 10 min. A continuación, los cultivos celulares se lavaron tres veces con PBS y se incubaron por una hora con la solución bloqueadora (PBS adicionado con 0.1% de Triton X-100 y 10% de suero de caballo). Después se realizaron tres lavados con PBS. Posteriormente, los cultivos celulares fueron incubados por 12 horas a 4°C con el anticuerpo primario policlonal de conejo dirigido contra la proteína ácido glúo fibrilar (GFAP; Diasorin, Stillwater, MN) diluido 1:10 en PBS. A continuación, los cultivos celulares se lavaron tres veces con PBS y se incubaron por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de cabra (diluido 1:250 con PBS) contra inmunoglobulina de conejo, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma, St. Louis MO). Finalmente, los cultivos se lavaron tres veces y se les agregó PBS con glicerol al 30%. Las células se observaron con un

microscopio epifluorescente para determinar el número de células que fueron inmunorreactivas. Las imágenes fueron digitalizadas con una cámara monocromática y editadas con un software comercial.

En los experimentos control, los cultivos celulares siguieron todo el procedimiento descrito anteriormente; sin embargo no fueron tratadas con el anticuerpo primario contra GFAP. En estos casos, las células no mostraron fluorescencia significativa.

III. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Las corrientes de membrana se registraron de astrocitos, entre cuatro y siete días de cultivo, usando la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula completa (Hamill et al., 1981). Los registros eléctricos se realizaron en astrocitos completamente aislados, es decir, sin células cercanas en al menos 300 μm . Un fragmento del cubreobjeto, en donde se cultivaron los astrocitos, se colocó en la cámara de registro ($\sim 200 \mu\text{L}$), colocada sobre la platina de un microscopio invertido (Olympus IX-70, Japan). La cámara de registro era perfundida constantemente ($\sim 4\text{mL}/\text{min}$), con la solución control, que contenía (en mM): 136 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 10 Hepes, 10 glucosa, pH ajustado a 7.4 con NaOH. Las pipetas de registro se fabricaron con capilares de borosilicato utilizando un estirador de micropipetas (P97, Flaming/Brown, Sutter Instruments, CA, USA). Las pipetas de registro fueron llenadas con una solución que contenía (en mM): 130 gluconato de potasio, 10 NaCl, 10 Hepes, 10 EGTA, 2 Na₂ATP, 0.2 MgGTP, pH ajustado a 7.2 con KOH. En una serie de experimentos, las pipetas fueron llenadas con una solución que contenía (en mM): 80 CsCl, 80 CsF, 10 EGTA, 10 Hepes, pH ajustado a 7.2 con CsOH. En ambas

condiciones las pipetas de registro tuvieron resistencia de 3-5 M Ω . Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-23°C). Las corrientes capacitivas y las corrientes de fuga se cancelaron electrónicamente y digitalmente. Las corrientes fueron registradas con un amplificador Axopatch 200B (Axon instruments, CA, USA), filtradas a 5 kHz, y digitalizadas a 100 Hz (para las corrientes generadas por nicotina), a 3.3 kHz (para los pulsos de voltaje), y a 0.5 kHz (para las rampas de voltaje). Los datos se analizaron con el programa "pClamp 8.2" (Axon Instruments, CA, USA). Los resultados se presentan como el promedio \pm el error estándar (S.E.).

IV. REGISTRO DE LAS VARIACIONES DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR

Las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ se registraron en astrocitos completamente aislados, entre cuatro y siete días de cultivo, usando el indicador fluorescente fluo-4 en su forma esterificada (fluo-4 AM; Molecular Probes, Eugene Oregon, USA). Los cubreobjetos en donde se cultivaron los astrocitos se incubaron por 30 min a temperatura ambiente con 10 μ M de fluo-4 AM, diluido en la solución control (ver registros electrofisiológicos). Después, las células se lavaron tres veces, por 10 min, con la solución control. El procedimiento descrito permite la entrada del fluo-4 AM a las células, donde las enzimas citoplásmicas des-esterifican el indicador. A continuación, un fragmento del cubreobjeto, con las células cargadas con fluo-4, se colocó en la cámara de registro (~500 μ L) colocada sobre la platina de un microscopio vertical (Axioskop 2FS mot, Carl Zeiss, Inc). La cámara de registro se mantuvo con perfusión constante (4 mL/min) con la solución control.

Las mediciones de las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ se realizaron con un microscopio confocal (LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Inc.). Se utilizaron objetivos de 40 y 63x, con apertura numérica de 0.8 y 0.9, respectivamente. La luz que excitó al fluo-4 (absorción máxima de 490 nm) fue de 488 nm, proporcionada por un láser Argón-2 atenuado al 2.5% de su potencia total, para evitar el blanqueamiento del fluo-4. La luz de emisión del fluo-4, fue registrada entre 500 y 530 nm porque su emisión máxima es de 516 nm. Las imágenes de 512 x512 píxeles se colectaron a una frecuencia de 1 Hz, es decir, una imagen por segundo. Los parámetros de iluminación y detección se controlaron digitalmente para mantenerlos iguales en todos los experimentos. La adquisición y análisis de las imágenes se realizó con el programa LSM 510 Examiner (Carl Zeiss, Inc).

La fluorescencia se midió en el astrocito completo. Las respuestas son presentadas como $\% \Delta F/F_0$, donde F_0 es la fluorescencia de las células en estado basal adquirida al inicio del experimento, antes de la aplicación del estímulo y ΔF es el cambio de la fluorescencia con respecto al nivel basal. El incremento de la señal fluorescente generada por el fluo-4, representada en forma porcentual, corresponde a un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos.

V. APLICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS

En todos los registros, tanto electrofisiológicos como de las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$, la perfusión de la solución control (con y sin antagonistas de receptores nicotínicos) se realizó con un sistema de perfusión por gravedad. En una base de acrílico, a 40 cm de altura con respecto a la cámara de registro, se colocó una jeringa de 60 mL con la solución a perfundir, conectada con un tubo flexible (Tygon, Fisher

scientific company, Pennsylvania, USA) a una cánula epidural (Equipo médico Vizcarra, SA, México). El capilar epidural se colocó en un extremo de la cámara de registro. La solución de la cámara de registro, se aspiró continuamente con una manguera conectada a un sistema de vacío. La velocidad del flujo de la solución fue de ~4 mL/min. En los registros electrofisiológicos y en algunos experimentos de las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$, la sustancia de prueba se aplicó utilizando el sistema de perfusión por gravedad descrito, utilizando una jeringa adicional.

En los experimentos de las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ la perfusión de las sustancias de prueba se realizó con un tubo en “U” cuyo diámetro en la punta era de ~250 μ m. La punta del tubo en “U” se colocó a una distancia entre 200 y 300 μ m de la célula a registrar, en dirección contraria a la perfusión por gravedad de la solución control. El sistema se controló con una válvula de solenoide (Cole-Parmer, Vernon Hills IL, USA). Con este sistema, las sustancias de prueba llegaron a toda la célula registrada casi inmediatamente, y además, el lavado también fue rápido.

VI. SUSTANCIAS

Las drogas usadas fueron la 4-aminopiridina, acetilcolina, atropina, nicotina, mecamilamina, metilcaconitina, dihidro- β -eritroidina y cloruro de teraetilamonio (Sigma-Aldrich, MO, USA). Las drogas se prepararon en soluciones concentradas con agua destilada y se guardaban a -4°C. Al inicio de cada experimento, las drogas se diluyeron a la concentración de trabajo en la solución control.

CAPÍTULO 6: RESULTADOS

Él, como científico, y yo, como escritor, ansiamos que el ser humano aprenda por fin a entenderse a sí mismo, que es un tema científico eminente cuya belleza se confunde con la poesía.
Gabriel García Márquez

En el presente trabajo estudiamos los efectos que ejerce la nicotina en los astrocitos en cultivo de la región CA1 de hipocampo de rata, utilizando las técnicas de fijación de voltaje en la configuración de la célula completa, y la medición de los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ con el indicador fluo-4 AM.

I. IDENTIFICACIÓN DE LOS ASTROCITOS EN CULTIVO

Los astrocitos fueron identificados con criterios inmunocitoquímicos y electrofisiológicos (ver Bordey y Sontheimer, 1997; Bushong et al., 2002). Las células en cultivo mostraron un cuerpo celular irregular con arborizaciones ramificadas (Figura 4A-D). En algunos cultivos celulares confluentes ($n = 5$) se realizaron ensayos con un anticuerpo dirigido contra la GFAP. Más del 99% de las células, en los cultivos examinados, fueron positivas para GFAP (Figura 4B, D), indicando su linaje astrocítico. Además, al inicio de algunos experimentos electrofisiológicos se aplicaron a la célula pulsos de voltaje, de -120 a 80 mV con incrementos de 20 mV y 10 ms de duración, para explorar la posible presencia de corrientes de sodio, característica de neuronas (French y Zamponi, 2005). En todos los astrocitos examinados ($n = 158$), los pulsos de voltaje no produjeron corrientes entrantes de sodio, únicamente se generaron corrientes salientes (Figura 4E). Las relaciones corriente voltaje ($I-V$) se obtuvieron graficando la corriente máxima en función del voltaje de cada pulso (Figura 4F). Generalmente no se obtuvo corriente entre -120 y -40 mV. A partir de -20 mV se activó una corriente

saliente, cuya magnitud aumentó gradualmente con los pulsos despolarizantes. En todos los astrocitos examinados, el perfil de la relación I - V mostró corrientes salientes de potasio, que son características de los astrocitos (Bordey y Sontheimer, 1997).

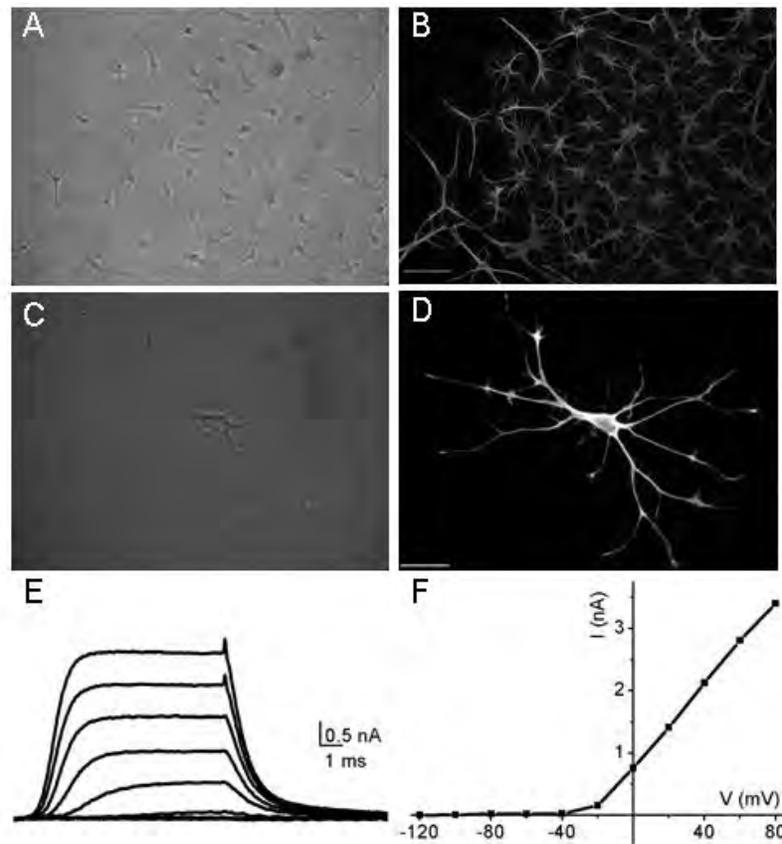


Figura 4. Astrocitos en cultivo de la región CA1 de hipocampo. (A, C) Imágenes en contraste de fases de astrocitos en el día siete de cultivo. **(B, D)** Mismos campos que en (A, C) obtenidos con fluorescencia. Los astrocitos fueron marcados con el anticuerpo dirigido contra la GFAP. La barra de calibración corresponde a $100\ \mu\text{m}$ (A, B) y a $10\ \mu\text{m}$ (C, D). **(E)** Corrientes generadas por pulsos de voltaje en un astrocito en cultivo (ver texto). **(F)** Relación I - V obtenida de las corrientes en (E) (ver texto). El potencial de mantenimiento en este y todos los experimentos fue de $-60\ \text{mV}$.

II. RESPUESTAS ELÉCTRICAS GENERADAS POR NICOTINA EN ASTROCITOS DE HIPOCAMPO

A continuación, estudiamos los cambios de la corriente iónica basal generados por nicotina en los astrocitos de hipocampo. Los registros eléctricos se realizaron en astrocitos completamente aislados, entre cuatro y siete días de cultivo. En 76 de 180 astrocitos registrados, 1 mM de nicotina modificó la corriente basal. De manera muy interesante, las células mostraron diferentes tipos de respuestas. En 33 astrocitos la nicotina generó una corriente entrante sostenida, es decir que no decayó en presencia de nicotina, con una amplitud de 223 ± 32 pA (Figura 5A). En 11 astrocitos la nicotina produjo una corriente entrante que decayó aun en presencia de nicotina, en estos casos la amplitud de la respuesta fue muy variable, entre 31 y 957 pA (Figura 5B). Por otra parte, la nicotina produjo respuestas bifásicas en 25 células, una corriente saliente (94 ± 25 pA) y después una corriente entrante (140 ± 22 pA) (Figura 5C). Finalmente, en un número menor de astrocitos la nicotina generó una corriente saliente con amplitud entre 41 y 1051 pA ($n = 7$, Figura 5D). En todos los casos la corriente volvió al nivel basal después de retirar la nicotina.

Es importante anotar que no se observó correlación entre el día de cultivo de los astrocitos (de 4 a 7 días) y el tipo de respuesta generada con nicotina. Además, los diferentes tipos de respuesta se encontraron incluso en diferentes astrocitos provenientes del mismo cultivo. También, los diferentes tipos de respuesta fueron independientes de la concentración de nicotina, y la aplicación sucesiva de nicotina al mismo astrocito produjo el mismo tipo de respuesta (datos no mostrados).

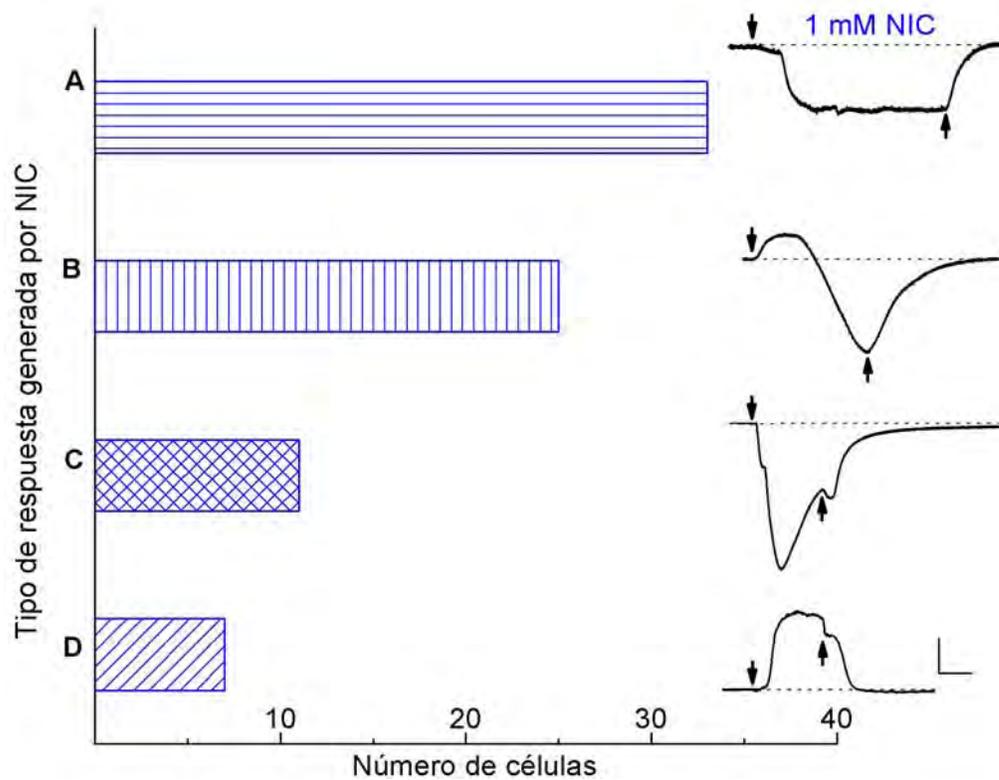


Figura 5. Respuestas eléctricas generadas por nicotina en astrocitos de hipocampo. (A-D) Ejemplos de corrientes iónicas generadas con 1 mM de nicotina (NIC) en cuatro astrocitos entre los días cuatro y siete de cultivo. Las barras horizontales a la izquierda corresponden al número de células que respondieron a la nicotina para cada tipo de respuesta ilustrada a la derecha. En esta y las siguientes Figuras el tiempo de aplicación de nicotina está indicado por las flechas, las líneas discontinuas corresponden al nivel de la corriente basal. Barra vertical = 200 pA. Barra horizontal = 5 s para (B, D) y 10 s para (A, C).

A. AUMENTO Y DISMINUCIÓN DE LA CORRIENTE TRANSMEMBRANAL POR NICOTINA

La nicotina generó diferentes tipos de respuestas, incluyendo corrientes entrantes sostenidas, corrientes entrantes que decayeron en presencia de nicotina, corrientes bifásicas y corrientes salientes. Nosotros nos enfocamos en el estudio de las corrientes entrantes sostenidas, debido a que estas respuestas se presentaron con mayor frecuencia (43% de los astrocitos que respondieron a nicotina). Este tipo de respuesta corresponde a una despolarización prolongada de la membrana la cual podría ser importante en la función de los astrocitos como moduladores de la actividad neuronal en el sistema nervioso central. Cuando se despolariza su membrana se genera un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, que a su vez produce la liberación de transmisores que inciden en las neuronas (Jourdain et al., 2007; Perea y Araque, 2005).

Para examinar con más detalle los efectos de la nicotina, aplicamos rampas de voltaje (de -120 a 80 mV en 1 s) antes y durante las respuestas entrantes sostenidas generadas por nicotina (Figura 6A, 7A). Con las corrientes generadas por las rampas de voltaje se construyeron las relaciones I - V . Esto nos permitió establecer el potencial de inversión de la corriente y los cambios en la conductancia de la membrana del astrocito.

En 9 de 32 células la corriente generada por la rampa de voltaje durante la respuesta a nicotina mostró un aumento de la corriente entrante y, en menor medida, de la corriente saliente, ambas con respecto a la corriente control (Figura 6B). En este ejemplo, el potencial de inversión de la corriente en presencia de nicotina se desplazó hacia voltajes positivos con respecto al control, de -60 a -45 mV. Además, la pendiente de la relación I - V , que corresponde a la conductancia de la membrana, aumentó entre -120 y 0 mV en presencia de nicotina, con respecto a la relación I - V control. Para

observar el efecto de la nicotina, restamos la relación $I-V$ control de la relación $I-V$ en presencia de nicotina. Así, en estas células, la relación $I-V$ de la corriente neta generada por nicotina mostró una rectificación entrante, es decir, la pendiente de la relación $I-V$ entre -120 y 20 mV es mayor que a voltajes más positivos, su potencial de inversión fue de -6 ± 1.3 mV (Figura 6C, $n = 9$). Estas propiedades de la relación $I-V$ son similares a las de los receptores nicotínicos en neuronas y astrocitos de hipocampo (Alkondon y Albuquerque, 1993; Sharma y Vijayaraghavan, 2001), sugiriendo fuertemente que la nicotina activa receptores nicotínicos en astrocitos de hipocampo.

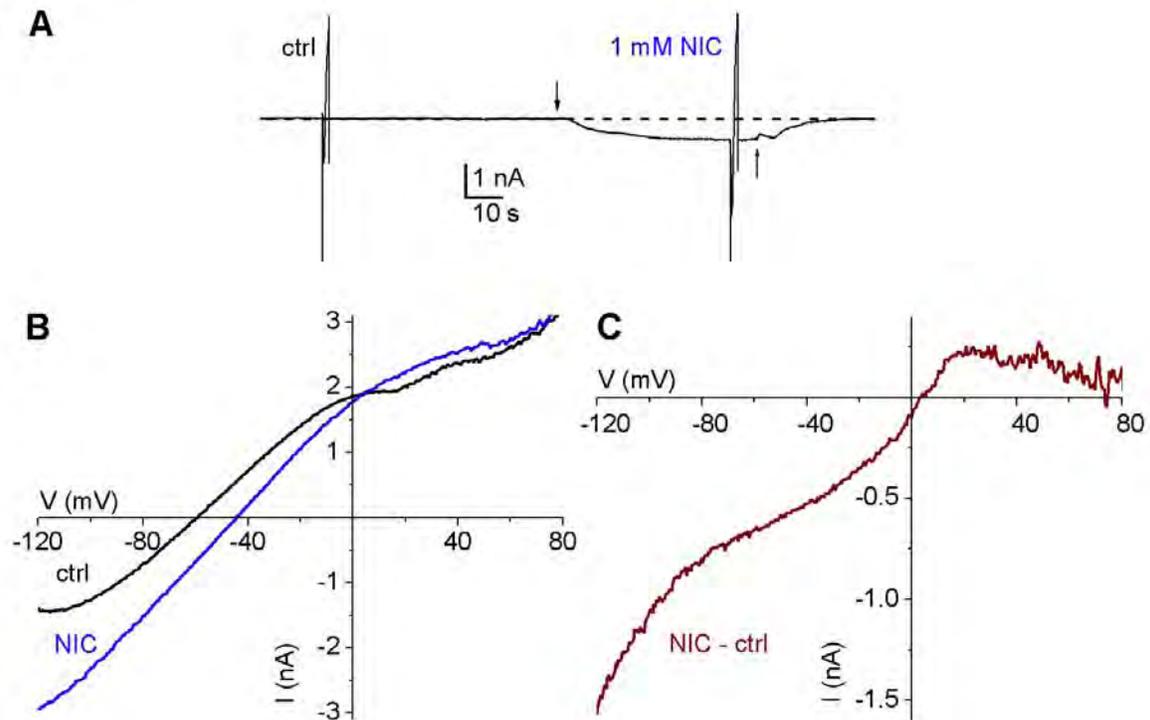


Figura 6. La nicotina aumenta la corriente iónica de los astrocitos. (A) Corriente entrante sostenida generada por nicotina en un astrocito de hipocampo. Las líneas verticales son las corrientes de membrana generadas por las rampas de voltaje (ver texto) aplicadas en la solución control (ctrl) y en presencia de nicotina (1 mM NIC). (B) Relaciones I - V (obtenidas del registro en A). (C) Relación I - V de la corriente neta generada por nicotina, obtenida restando la relación I - V control de la relación I - V en presencia de nicotina (NIC - ctrl). La magnitud de las corrientes se midió desde la corriente basal (línea discontinua).

Por otra parte, en 23 astrocitos, la corriente generada por la rampa de voltaje, durante la respuesta a nicotina, mostró un aumento pequeño de la corriente entrante y una disminución considerable de la corriente saliente (Figura 7B). La nicotina disminuyó significativamente la corriente saliente $14.6 \pm 2.4\%$ ($n = 23$) a 80 mV, con respecto a la corriente control. En el ejemplo de la Figura 7B, el potencial de inversión de la corriente en presencia de nicotina fue -20 mV, mientras que la corriente control invirtió en -60 mV. Además, entre -120 y -20 mV las pendientes de las relaciones I - V control y con nicotina fueron semejantes. En cambio, entre -20 y 80 mV tanto la corriente como la pendiente de la relación I - V en presencia de nicotina fueron menores que las de la relación I - V control, indicando una disminución de la conductancia de la membrana por efecto de la nicotina y por tanto una inhibición de la corriente saliente. En estos astrocitos la resta de la relación I - V en presencia de nicotina menos la relación I - V control muestra la corriente inhibida por nicotina (Figura 7C). En algunos de los astrocitos en los que la nicotina produjo una inhibición de la corriente saliente, también se observó, entre -20 y 80 mV, un aumento de la corriente entrante, sugiriendo que la nicotina produjo ambos efectos sobre las corrientes activadas por las rampas de voltaje ($n = 7$, dato no mostrado).

Los resultados presentados hasta aquí indican que la nicotina puede activar receptores nicotínicos, inhibir una corriente iónica saliente activada por voltaje o bien, ambos efectos, dando relaciones I - V complejas.

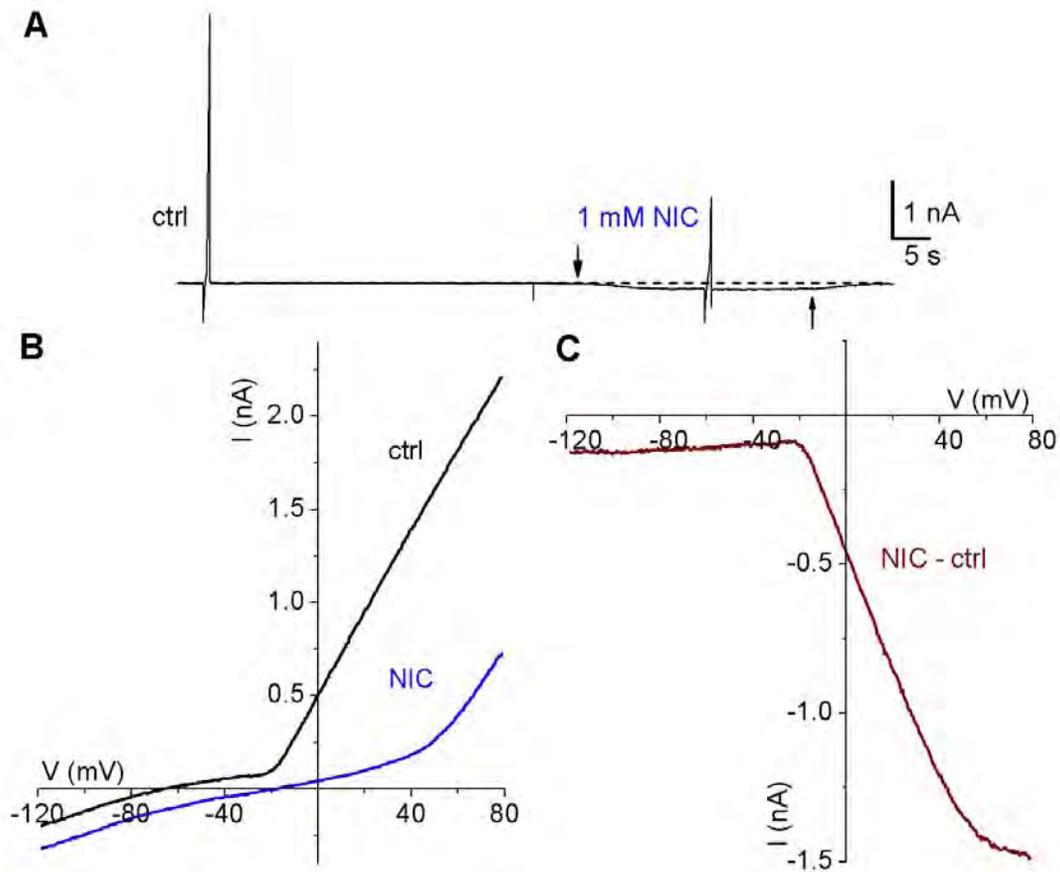


Figura 7. La nicotina disminuye la corriente saliente en astrocitos de hipocampo. (A) Respuesta entrante sostenida generada por nicotina en un astrocito. (B-C) Registros obtenidos como en la Figura 6.

B. ACTIVACIÓN DE RECEPTORES NICOTÍNICOS

El aumento de la conductancia de la membrana generado por la nicotina, observado en algunos astrocitos, al parecer se debe a la activación de receptores nicotínicos. Cuando los receptores nicotínicos son activados permiten el paso de los iones sodio, potasio y calcio a través de la membrana (Jensen et al., 2005; Quick y Lester, 2002; Takeuchi, 1963). Para explorar la posibilidad de que los receptores nicotínicos efectivamente son activados con nicotina, reemplazamos el potasio de la solución intracelular por cesio (ver Materiales y Métodos), que bloquea los canales de potasio (Hille, 2001). Así, al mantener inhibida la corriente de potasio, esperamos que el único efecto de la nicotina sea la activación de los receptores nicotínicos.

En estas condiciones, en cuatro de 11 astrocitos registrados, la aplicación de 1 mM de nicotina generó una corriente entrante que decayó ligeramente en presencia de nicotina (Figura 8A), con amplitudes que variaron de 62 a 185 pA ($n = 4$). En estas células se aplicaron rampas de voltaje antes y durante la respuesta a nicotina (ver Figura 6). La relación I - V de la corriente neta generada por nicotina tuvo un potencial de inversión entre -8 y 10 mV y no mostró rectificación (Figura 8B). Esta última característica es similar a la observada en neuronas de hipocampo con corrientes mediadas por receptores nicotínicos que contienen la subunidad $\alpha 7$ (Alkondon y Albuquerque, 1993). Para verificar que la respuesta fue mediada por receptores nicotínicos, se aplicó 100 μ M de mecamilamina (antagonista de receptores nicotínicos de espectro amplio). En presencia del antagonista la nicotina no generó respuesta (Figura 8C). Después de lavar la mecamilamina por 10 min la respuesta se recuperó parcialmente, aproximadamente 25% de la primera respuesta (Figura 8D). Estos

resultados indican que en ~36% de astrocitos de la región CA1 de hipocampo, cuando la corriente de potasio se bloqueó, la nicotina generó respuestas a través de la activación de los receptores nicotínicos.

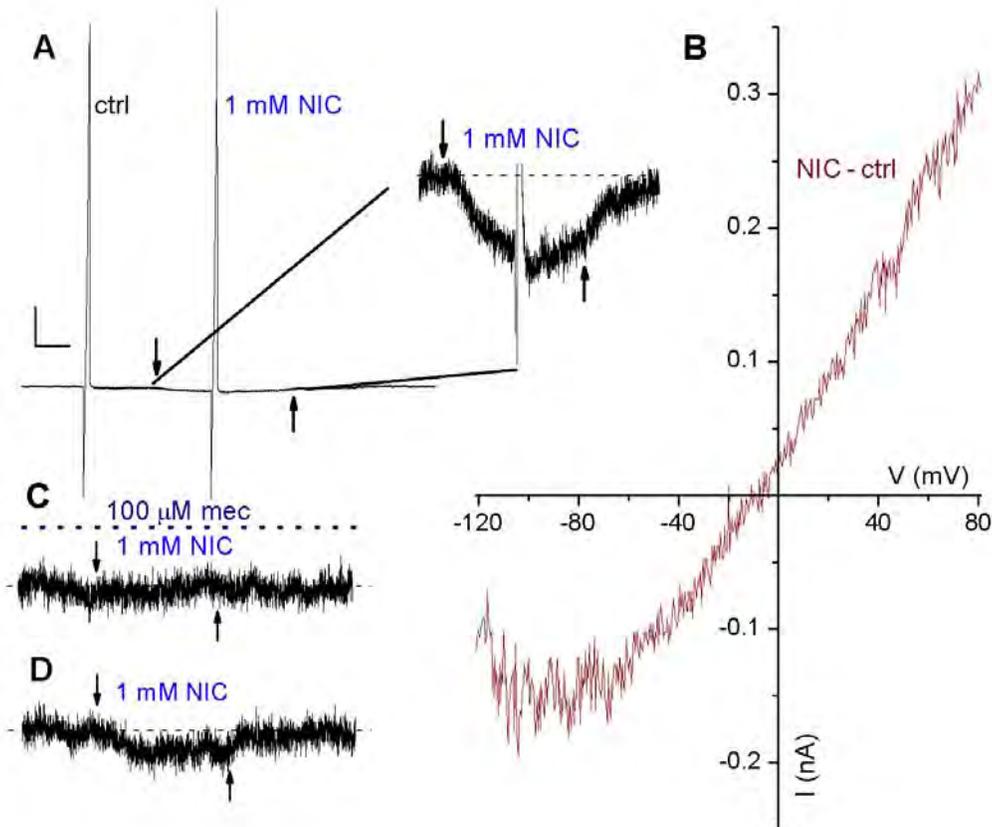


Figura 8. La nicotina activa receptores nicotínicos en astrocitos de hipocampo. (A) Corriente entrante generada con nicotina y las respuestas a rampas de voltaje, en solución control (ctrl) y durante la respuesta a nicotina (1 mM NIC). Inserto: la misma respuesta a mayor resolución. (B) Relación I - V de la corriente neta generada con nicotina obtenida de (A). (C) El astrocito fue preincubado con mecamilamina durante un min (mec, línea punteada) y en presencia de ésta se aplicó nicotina. En esta y las siguientes Figuras, la presencia de antagonistas de receptores nicotínicos se indica con una línea punteada arriba de los registros. (D) Recuperación de la respuesta a nicotina después de 10 min de lavado de la mecamilamina. La barra vertical corresponde a 1 nA para (A) y 50 pA para (B inserto, C, D). La barra horizontal corresponde a 5 s para todos los registros. Este es un ejemplo representativo de cuatro astrocitos.

C. INHIBICIÓN DE LAS CORRIENTES IÓNICAS POR NICOTINA

Existen pocos reportes que muestran los efectos directos de la nicotina en canales iónicos activados por voltaje. Por ejemplo, la nicotina inhibe directamente diversos canales en miocitos ventriculares, en células de músculo liso de arterias y en neuronas ganglionares (Liu et al., 2004; Satoh, 2002; Tang et al., 1999; Wang et al., 1999a,b; 2000a,b). A la fecha, no hay reportes acerca del efecto de la nicotina sobre las corrientes iónicas en astrocitos. Para examinar esta posibilidad procedimos a eliminar la contribución de los receptores nicotínicos, y de esta manera observar únicamente el efecto de la nicotina sobre las corrientes iónicas astrocíticas. Para tal propósito perfundimos los astrocitos de hipocampo, por al menos 10 min antes de aplicar nicotina, con una mezcla de antagonistas de receptores nicotínicos que incluyó, 100 μ M de mecamilamina (antagonista de receptores nicotínicos no selectivo; Papke et al., 2001), 10 nM de metilcaconitina (antagonista de receptores nicotínicos que contienen la subunidad $\alpha 7$; Dwoskin y Crooks, 2001) y 10 nM de dihidro- β -eritroidina (antagonista de receptores nicotínicos que contienen las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$; Dwoskin y Crooks, 2001). Cabe resaltar que la mezcla de antagonistas de receptores nicotínicos no tuvo efecto sobre las corrientes de iónicas activadas por voltaje ($n = 8$, dato no mostrado).

En estas condiciones aplicamos pulsos de voltaje de 200 ms, de -120 a 80 mV con incrementos de 20 mV, antes y durante la presencia de 1 mM de nicotina. (Figura 9A₁, A₂). La nicotina redujo considerablemente las corrientes salientes en todos los astrocitos examinados, aún cuando los receptores nicotínicos fueron bloqueados con la mezcla de antagonistas para receptores nicotínicos (Figura 9A₂, B). A 80 mV, voltaje al cual la nicotina ejerció el efecto de inhibición más drástico (Figura 9B), la corriente

máxima disminuyó $29.9 \pm 6.4\%$ y la corriente al final del pulso de voltaje disminuyó $42.0 \pm 9.3\%$ ($n = 12$).

Las relaciones $I-V$ fueron construidas tanto con la corriente máxima como con la corriente al final de cada pulso de voltaje (Figura 9C, D, respectivamente). La pendiente, que corresponde a la conductancia de la membrana, no cambió en presencia de nicotina entre -120 y -40 mV. A partir de -20 mV, la magnitud de la corriente saliente control aumentó gradualmente con los pulsos despolarizantes (Figura 9C, D cuadros). La nicotina disminuyó la magnitud de estas corrientes, redujo también las pendientes de las relaciones $I-V$ y desplazó los potenciales de inversión a valores más positivos con respecto al control (Figura 9C, D círculos). La diferencia obtenida, restando a la relación $I-V$ en presencia de nicotina la relación $I-V$ control, indica la magnitud de la corriente inhibida por la nicotina en cada pulso de voltaje (Figura 9C, D triángulos).

Los resultados anteriores revelan que la nicotina inhibe las corrientes iónicas salientes en los astrocitos de hipocampo. Asimismo, este efecto no está mediado por receptores nicotínicos, sugiriendo que la nicotina interactúa directamente con los canales iónicos.

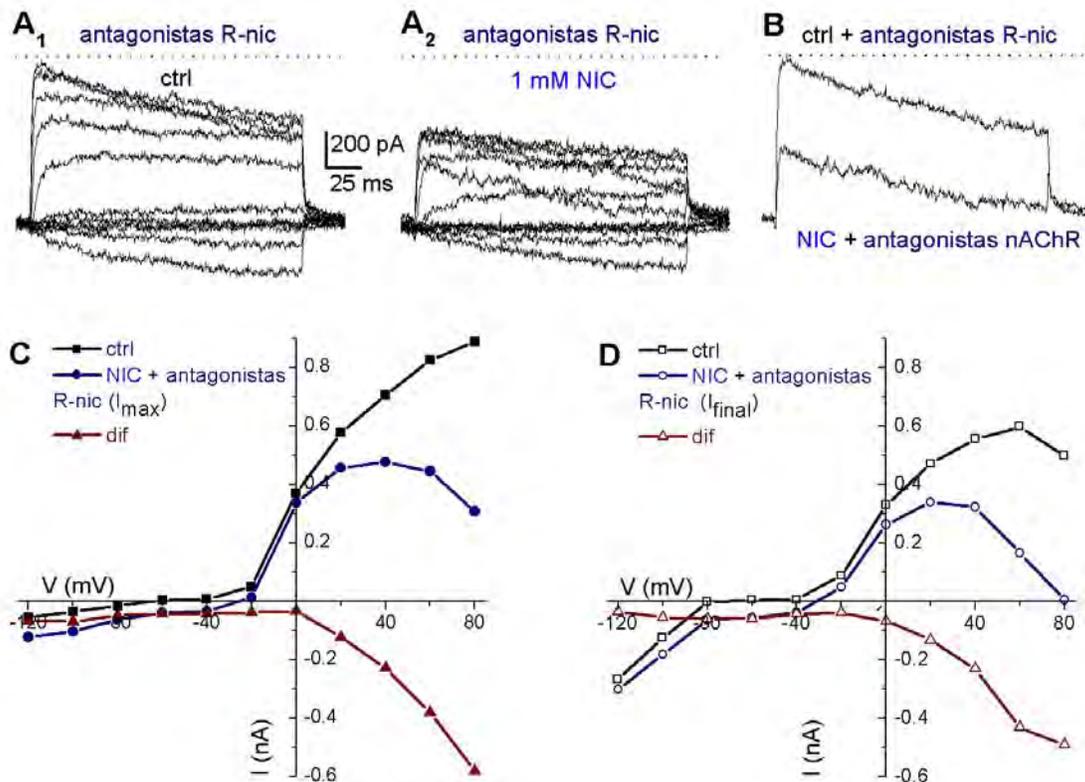


Figura 9. Inhibición de corrientes iónicas por nicotina. Corrientes iónicas generadas por pulsos de voltaje (ver texto) en presencia continua de una mezcla de antagonistas de receptores nicotínicos (R-nic; línea punteada): 100 μ M mecamilamina, 10 nM metilcaconitina más 10 nM dihidro- β -eritroidina, en ausencia (A₁) y en presencia de nicotina (A₂). (B) Corrientes generadas a 80 mV, en condiciones control y en presencia de nicotina. Relaciones *I-V* para la corriente máxima (C, *I*_{max}) y para la corriente al final de los pulsos de voltaje (D, *I*_{final}), obtenidas de (A₁) y (A₂) en la solución control y durante la aplicación de nicotina (cuadros y círculos, respectivamente). Las diferencias de las relaciones *I-V* en presencia y ausencia de nicotina (dif, triángulos) se obtuvieron como en la Figura 6.

D. INHIBICIÓN DE LAS CORRIENTES DE POTASIO POR NICOTINA

En el hipocampo, los astrocitos tienen al menos tres tipos de corrientes de potasio, la corriente de rectificación tardía (K_{DR}), la corriente transitoria tipo "A" (K_A) y la corriente de rectificación entrante (K_{IR}) (Sontheimer y Waxman, 1993). Debido a que la nicotina inhibe principalmente las corrientes salientes, que en los astrocitos son mediadas en su mayoría por las corrientes K_{DR} y K_A , se utilizó un protocolo de voltaje que activa únicamente estas dos corrientes. El protocolo consistió en un prepulso (de -110 mV por 400 ms, que le remueve la inactivación a la corriente K_A) seguido de pulsos de voltaje de 200 ms de -60 a 80 mV con incrementos de 20 mV (Connor y Stevens, 1971; Reyes-Haro et al., 2005). Los astrocitos se perfundieron continuamente con la mezcla de antagonistas de receptores nicotínicos (ver sección anterior) y el protocolo de voltaje se aplicó en ausencia y en presencia de 1 mM de nicotina.

En 12 de 20 astrocitos examinados, los pulsos de voltaje generaron ambas corrientes, una transitoria y una corriente que no decayó, con características similares a las corrientes K_A y K_{DR} , respectivamente (Figura 10A, ctrl). La corriente saliente se activó a partir de -20 mV, y la amplitud aumentó gradualmente con voltajes más positivos. En estos astrocitos la nicotina redujo la magnitud de la corriente saliente con respecto al control (Figura 10A, derecha). Por otra parte, la corriente inhibida por la nicotina (a 80 mV), obtenida restando la corriente en presencia de nicotina de la corriente en la solución control, no decayó durante los 200 ms de duración del pulso de voltaje, característica de la corriente K_{DR} (Figura 10B, inserto). La Figura 10B muestra, en condiciones control y durante la aplicación de nicotina, las relaciones $I-V$ para las

corrientes al final del pulso de voltaje. La nicotina redujo, entre -20 y 80 mV, la amplitud de la corriente y la pendiente de la relación I - V con respecto al control.

Adicionalmente, en 8 astrocitos los pulsos de voltaje generaron únicamente corrientes salientes que no decayeron (Figura 10C, ctrl). Estas corrientes se activaron a partir de -20 mV y su magnitud aumentó gradualmente a voltajes más positivos. La nicotina redujo la amplitud de estas corrientes (Figura 10C, derecha) y la corriente inhibida no decayó durante el pulso de voltaje a 80 mV (Figura 10D, inserto). Como en la Figura 10B, entre -20 y 80 mV, la nicotina redujo tanto la amplitud de la corriente como la pendiente de la relación I - V con respecto al control (Figura 10D).

En los astrocitos que generaron tanto corrientes transitorias como corrientes que no decaen, así como en los que sólo generaron éstas últimas, la nicotina inhibió el componente de la corriente que no decae $43 \pm 7\%$ a 80 mV con respecto al control ($n = 20$).

Para verificar que la inhibición de la corriente de potasio es un efecto específico de la nicotina, se aplicó 1 mM de acetilcolina en la presencia continua de los antagonistas de receptores nicotínicos y 500 nM atropina para eliminar el componente muscarínico. En estas condiciones, la acetilcolina no tuvo efecto sobre las corrientes de potasio ($n = 8$, dato no mostrado).

Para comparar el efecto inhibitor de la nicotina sobre la corriente saliente de potasio de los astrocitos de hipocampo, aplicamos en la perfusión tetraetilamonio a concentraciones altas (20 mM), que inhibe la mayoría de las corrientes de potasio (Hille, 2001). En astrocitos, el tetraetilamonio inhibe la corriente K_{DR} (Bordey y Sontheimer 1997; Reyes-Haro et al., 2005), la corriente K_A (Bekar et al., 2005) y la corriente K_{IR}

(Ransom and Sontheimer, 1995). En este trabajo, el tetraetilamonio ejerció efectos muy parecidos a los de la nicotina en seis astrocitos, inhibió una corriente saliente de potasio que se mantuvo constante hasta el final del pulso de voltaje a 80 mV (Figura 10E, F, inserto).

Estos resultados muestran que la nicotina inhibe la corriente saliente de potasio en los astrocitos de hipocampo y en todos los casos la magnitud de la corriente inhibida por la nicotina se mantiene constante hasta el final del pulso de voltaje a 80 mV, similar a las corrientes K_{DR} .

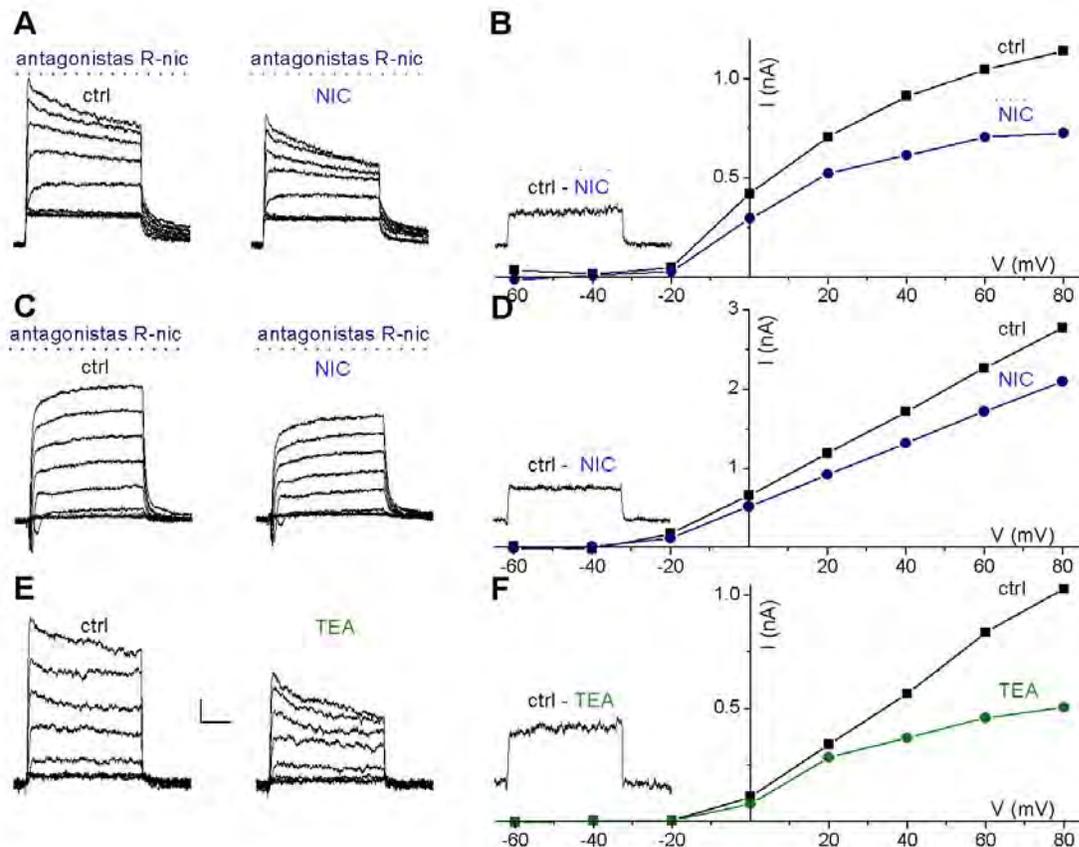


Figura 10. Inhibición de las corrientes de potasio por nicotina. (A, C) Corrientes iónicas generadas por pulsos de voltaje (ver texto) en la solución control (izquierda) y durante la aplicación de nicotina (derecha), ambos en presencia continua de antagonistas de receptores nicotínicos. (B, D) Relaciones I - V obtenidas de los registros de (A y C), la corriente se midió al final de cada pulso de voltaje, en solución control (cuadros) y con nicotina (círculos). Insertos: Corrientes inhibidas por nicotina a 80 mV, se obtuvieron restando la corriente en presencia de nicotina de la corriente control (ctrl - NIC). (E) Corrientes obtenidas en la solución control (izquierda) y en presencia de 20 mM de tetraetilamonio (TEA, derecha). (F) Relaciones I - V de los registros en (E) en la solución control (cuadros) y con TEA (círculos). Inserto: Corriente inhibida por TEA a 80 mV (ctrl - 20 mM TEA). Barra vertical 0.3 nA (A, B inserto), 0.5 nA (C, D inserto) y 0.2 nA (E, F inserto). Barra horizontal = 50 ms para todos los trazos.

A continuación examinamos el efecto de concentraciones más bajas de nicotina (100 nM y 100 μ M) en astrocitos de hipocampo. Como en la Figura 10, en presencia de los antagonistas de receptores nicotínicos se aplicaron pulsos de voltaje antes y durante la aplicación de 100 nM, 100 μ M y 1 mM de nicotina. Las relaciones *I-V* muestran que la corriente de potasio fue inhibida, entre -20 y 80 mV, con las tres concentraciones de nicotina, con respecto al control, (Figura 11A). Además, la pendiente de las relaciones *I-V*, y por lo tanto la conductancia de la membrana, fue menor en presencia de nicotina con respecto al control. La inhibición de la corriente de potasio a 80 mV fue de $6.8 \pm 2.1\%$ ($n = 11$) con 100 nM, $13.0 \pm 4.3\%$ ($n = 5$) con 100 μ M, y $40.6 \pm 5.9\%$ ($n = 23$) con 1 mM de nicotina (Figura 11B). La inhibición de la corriente de potasio fue estadísticamente significativa con las tres concentraciones de nicotina. Se observó una recuperación parcial después de lavar la nicotina por 10 min.

Enseguida evaluamos el efecto de 100 nM de nicotina durante aplicaciones de hasta 20 min sobre las corrientes de potasio generadas por un pulso de voltaje a 80 mV (Figura 11C). La inhibición fue de $31.5 \pm 6.7\%$ ($n = 6$) a los 10 min, $42.6 \pm 9.8\%$ ($n = 5$) a los 15 min, y 56.4 ± 9.6 ($n = 4$) a los 20 min (Figura 11D). Después de lavar la nicotina por 5 min la recuperación de la corriente de potasio fue baja (Figura 11A).

Estos resultados indican que, en astrocitos de hipocampo, la nicotina inhibe las corrientes salientes de potasio desde concentraciones tan bajas como 100 nM y la inhibición es mayor al aumentar el tiempo de aplicación de la nicotina.

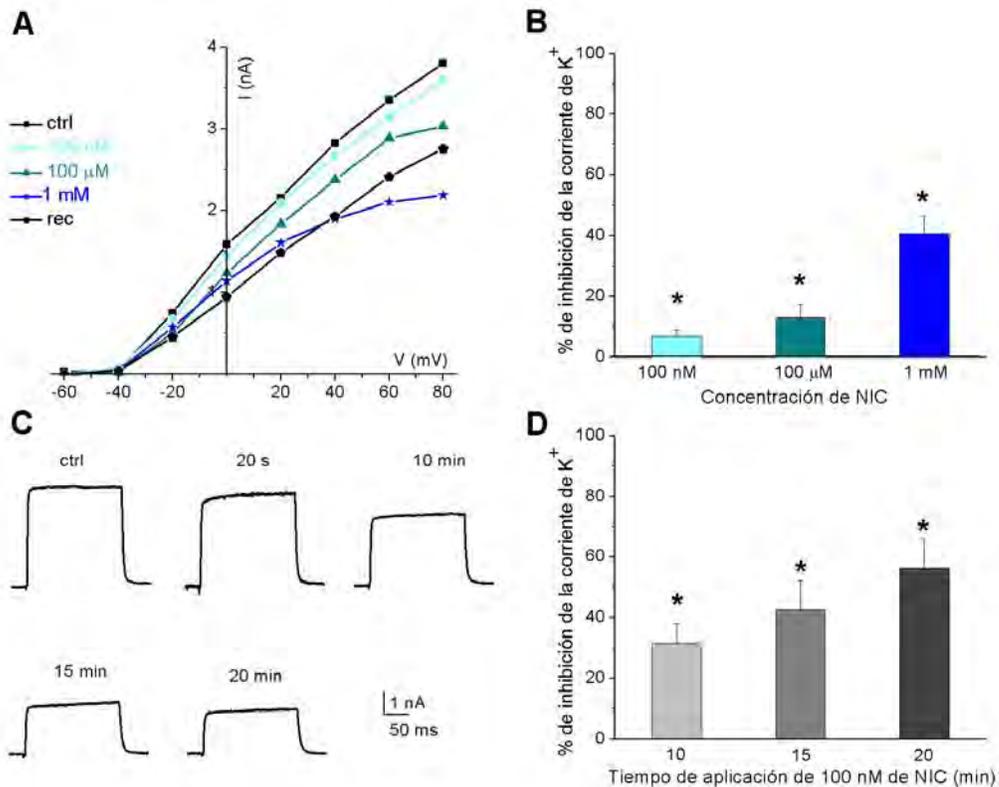


Figura 11. Concentraciones bajas de nicotina inhiben las corrientes de potasio.

(A) Relaciones (I - V) registradas en un astrocito, la corriente fue medida al final de cada pulso de voltaje, en ausencia (cuadros), en presencia de 100 nM (círculos), 100 μ M (triángulos) y 1 mM de nicotina (estrellas), y después de 10 min de lavado de la nicotina (rec, pentágonos). (B) Las columnas corresponden a la inhibición de la corriente de potasio (K^+) por diferentes concentraciones de nicotina ($*P < 0.05$; $n = 5-23$). (C) Corrientes generadas por un pulso de voltaje a 80 mV en un astrocito, en ausencia y en presencia de 100 nM de nicotina por 20 s, 10, 15 y 20 min. (D) Las columnas corresponden a la inhibición de la corriente de potasio por 100 nM de nicotina a los 10, 15 y 20 min ($*P < 0.05$; $n = 4-6$).

III. AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR GENERADO POR NICOTINA EN ASTROCITOS DE HIPOCAMPO

La nicotina genera aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en neuronas (Barrantes et al., 1995) y en astrocitos de la corteza cerebral (Oikawa et al., 2005). En esta parte del proyecto examinamos el efecto de la nicotina en los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ de astrocitos de la región CA1 de hipocampo, entre 4 y 7 días de cultivo. Nos interesamos en estudiar este efecto de la nicotina porque observamos que genera respuestas eléctricas en los astrocitos: activando receptores nicotínicos y/o inhibiendo una corriente de potasio. Estos efectos podrían generar cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos y es relevante debido a que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ produce la liberación de transmisores, que modulan la actividad neuronal (Jourdain et al., 2007; Perea y Araque, 2007).

Con el propósito de determinar si la nicotina ejercía algún efecto sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de los astrocitos de hipocampo, inicialmente utilizamos cultivos confluentes. La aplicación de la nicotina se hizo con un tubo en “U”, controlado por una válvula solenoide, colocado a una distancia de $\sim 300 \mu\text{m}$ de las células. En dos experimentos ($n = 2$ cultivos), la aplicación de nicotina por 2 s generó, en la mayoría de los astrocitos del campo registrado, un aumento de la fluorescencia, que corresponde a un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 12A). En los astrocitos que respondieron a la nicotina hubo diferencias en el tiempo de inicio de la respuesta. Algunos respondieron a la aplicación de la nicotina casi inmediatamente, mientras que otros respondieron tardíamente. Asimismo, en algunos casos, el aumento de fluorescencia de las células regresó al nivel basal (Figura 12B). Es difícil interpretar el efecto de la nicotina en la $[Ca^{2+}]_i$ de los astrocitos en cultivos confluentes porque se sabe que en estas condiciones están comunicados entre

sí a través de conexinas. Estas proteínas forman las uniones comunicantes que juegan un papel central en la propagación de las señales de calcio entre los astrocitos (Naus et al., 1997).

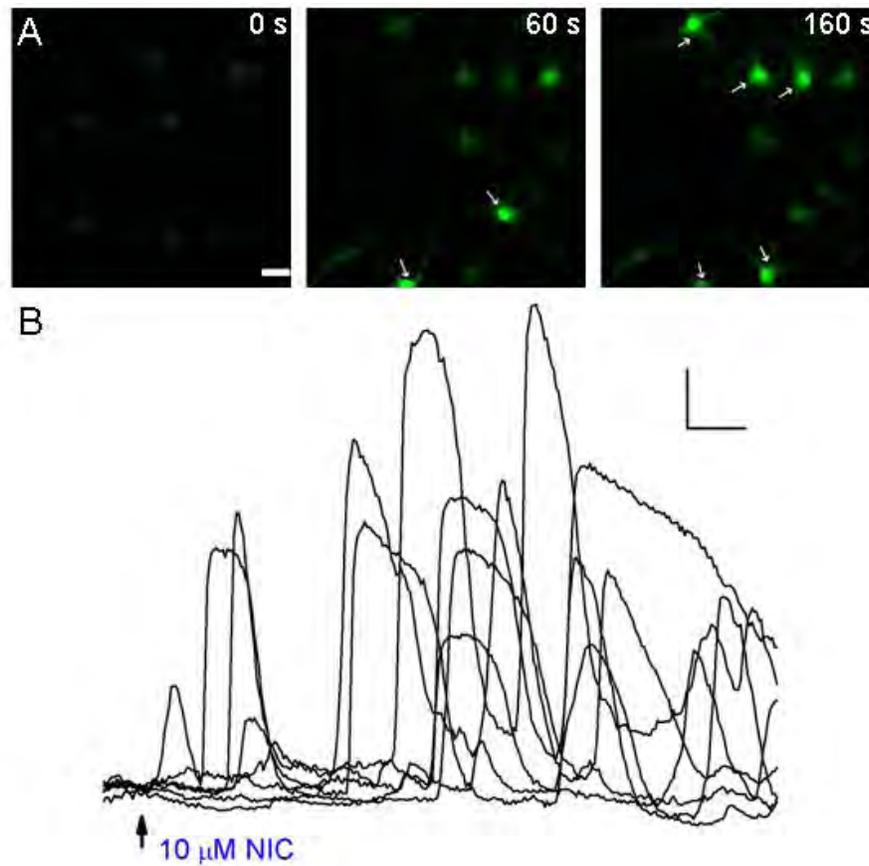


Figura 12. La nicotina aumenta la concentración de calcio libre intracelular en cultivos confluentes de astrocitos. (A) Imágenes fluorescentes de astrocitos antes (0 s), y después de la aplicación de 10 μ M de nicotina por 2 s. Las flechas blancas señalan algunos astrocitos que respondieron a la nicotina. Barra de calibración = 200 μ m. **(B)** Cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ en función del tiempo generados por nicotina en los astrocitos de (A). En los registros se midió la fluorescencia de todo el astrocito. Barra horizontal = 25 s, barra vertical = 50 % $\Delta F/F_0$. En ésta y las siguientes Figuras la aplicación de la nicotina se indica con la flecha.

A continuación investigamos el efecto de la nicotina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos en cultivo de hipocampo completamente aislados, sin células cercanas con las que pudieran tener comunicación. La aplicación de la nicotina se hizo con el tubo en “U” colocado entre 200 a 300 μm de la célula registrada. Encontramos que en 99 de 190 astrocitos ($n = 32$ cultivos) la aplicación local de 100 μM de nicotina por 2 s generó un incremento de la fluorescencia de $82 \pm 11\%$. Asimismo, en 8 de 11 astrocitos 1 mM de nicotina incrementó la fluorescencia en $85 \pm 5\%$ ($n = 7$ cultivos, dato no mostrado). Interesantemente, ambas concentraciones de nicotina produjeron respuestas sin diferencia significativa, por lo que en los siguientes experimentos utilizamos 100 μM . En algunos astrocitos ($n = 50$) el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ generado por nicotina fue rápido, transitorio y decayó al nivel basal. Sin embargo, después de la respuesta inicial se observaron otras respuestas transitorias (Figura 13A, B). En el resto de los astrocitos que respondieron a nicotina ($n = 49$), el aumento de la fluorescencia fue lento y gradual, sin regresar al nivel basal al final del registro (Figura 13C, D).

Es interesante notar que, aún cuando la aplicación de nicotina fue de tan sólo 2 s, las respuestas generadas fueron prolongadas, incluso sin regresar al nivel basal después de 5 min de registro. Además, el nivel de fluorescencia basal fue distinto entre los astrocitos, por ejemplo el astrocito de la Figura 13B tuvo mayor fluorescencia basal que el de la Figura 13A. Por otra parte, la aplicación de la solución de registro sin nicotina no produjo respuesta ($n = 18$ astrocitos, 3 cultivos), mientras que en estas mismas células, 100 μM de nicotina produjo respuesta en 8 de los 18 astrocitos (dato no mostrado). No se observó correlación entre el día de cultivo de los astrocitos (de 4 a 7 días) y el tipo de respuesta inducida por la nicotina, ni entre la morfología de los

astrocitos y el tipo de respuesta. Aplicaciones sucesivas de nicotina en el mismo astrocito generaron el mismo tipo de respuesta (datos no mostrados).

Los resultados arriba expuestos muestran que la nicotina produce aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos de la región CA1 de hipocampo. Estas respuestas podrían ser el resultado, por un lado, de la activación de los receptores nicotínicos por la nicotina, como lo hace en neuronas sensoriales e hipocampales (Barrantes et al., 1995; Xu et al., 2007), y como lo hace la acetilcolina en astrocitos de hipocampo (Sharma y Vijayaraghavan, 2001). Por otro lado, las respuestas de los astrocitos podrían deberse al efecto inhibitor de la nicotina sobre las corrientes de potasio, como los aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ generados por el tetraetilamonio en fibroblastos (Brzyska et al., 2002; Failli et al., 1996).

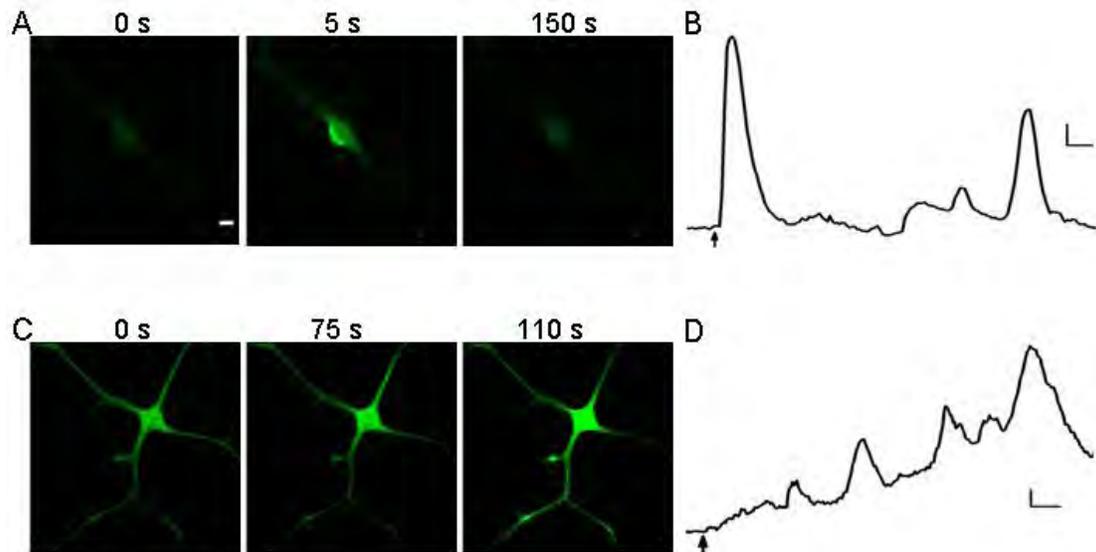


Figura 13. La nicotina aumenta la concentración de calcio libre intracelular en astrocitos aislado. (A, C) Imágenes fluorescentes de astrocitos antes (0 s), y después de la aplicación de 100 μ M de nicotina por 2 s. Barra de calibración = 10 μ m. **(B, D)** Cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ en función del tiempo generados por nicotina en los astrocitos de A y C, respectivamente. Barra horizontal = 20 s, barra vertical = 20 % $\Delta F/F_0$.

A. CAMBIOS DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR GENERADOS POR AGONISTAS DE RECEPTORES NICOTÍNICOS EN ASTROCITOS DE HIPOCAMPO

Los resultados de los experimentos electrofisiológicos indicaron que cuando se mantuvo inhibida la corriente de potasio, el efecto principal de la nicotina fue la activación de los receptores nicotínicos. En el registro de las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ no se separaron los efectos de la nicotina, la activación de receptores nicotínicos y/o la inhibición de la corriente de potasio. Para corroborar que la activación de los receptores nicotínicos en los astrocitos genera variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ utilizamos en esta serie de experimentos, además de la nicotina, acetilcolina y colina (Figura 14A) que son agonistas de receptores nicotínicos (Albuquerque et al., 2009; Gotti et al., 2006).

En 15 de 19 astrocitos la aplicación local de 100 μ M de acetilcolina por 2 s (en presencia de 500 nM atropina) generó un aumento de la fluorescencia de 38 ± 5 % ($n = 3$ cultivos). Adicionalmente, de 19 astrocitos examinados, 14 mostraron una respuesta generada por 100 μ M de colina de 31 ± 6 % ($n = 3$ cultivos). En todos los astrocitos examinados, los aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ generados tanto por acetilcolina como por colina fueron respuestas que se observaron a los pocos segundos después de la aplicación del agonista (Figura 14B). Además, la nicotina generó respuestas de mayor amplitud que la acetilcolina o la colina. Esto se podría explicar considerando que cada subtipo de receptor nicotínico tiene diferente sensibilidad a los agonistas (Luetje y Patrick, 1991). Es probable que los receptores nicotínicos de los astrocitos de hipocampo sean más sensibles a la nicotina que a los otros dos agonistas.

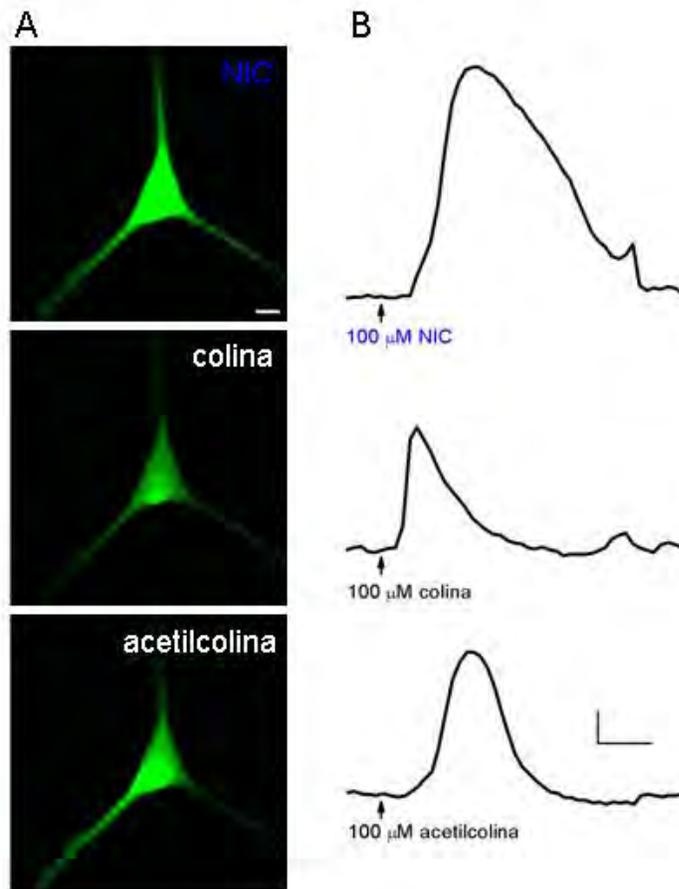


Figura 14. Agonistas de receptores nicotínicos generan aumentos de la concentración de calcio intracelular en astrocitos. (A) Imágenes fluorescentes del mismo astrocito durante las respuestas máximas generadas por nicotina, acetilcolina y colina. Barra de calibración = 10 μm . **(B)** Aumentos, en el mismo astrocito, de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generados por nicotina (NIC, arriba), colina (central) y acetilcolina (abajo), aplicadas por 2 s. Los lavados entre cada aplicación fueron de 5 min. Barra horizontal = 20 s, barra vertical = 20 % $\Delta\text{F}/\text{F}_0$.

B. AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR GENERADO POR NICOTINA EN PRESENCIA DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES NICOTÍNICOS

Como se determinó en los registros electrofisiológicos, la nicotina inhibe las corrientes de potasio y este efecto no está mediado por la activación receptores nicotínicos. Para evaluar si la inhibición de las corrientes de potasio por la nicotina produce un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos de hipocampo, utilizamos la siguiente estrategia. Primero, aplicamos 100 μ M de nicotina. Después, perfundimos los astrocitos con una mezcla de antagonistas de receptores nicotínicos (100 μ M de mecamilamina, 10 nM de metilcaconitina más 10 nM de dihidro- β -eritroidina) por al menos 10 min. Finalmente, en presencia de los antagonistas aplicamos nuevamente nicotina.

Los registros electrofisiológicos indican que la inhibición de la corriente de potasio por nicotina aumenta con aplicaciones prolongadas, por lo que en la siguiente serie de experimentos aumentamos el tiempo de aplicación de nicotina de 2 a 5 s y utilizamos el sistema de perfusión por gravedad. En 17 de 49 astrocitos, la nicotina generó un aumento de la fluorescencia de 88 ± 10 % (Figura 15, $n = 4$ cultivos), resultados similares a los de la Figura 13. La nicotina produjo tanto aumentos transitorios como aumentos graduales de la $[Ca^{2+}]_i$. Por otro lado, en 10 de 38 astrocitos la nicotina, en presencia de la mezcla de antagonistas de receptores nicotínicos, generó aumentos de la fluorescencia de 31 ± 3 % ($n = 6$ cultivos). En algunos astrocitos ($n = 10$) la nicotina produjo aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ tanto en ausencia como en presencia de la mezcla de los antagonistas (Figura 15A). En el ejemplo que se ilustra, la amplitud de la respuesta generada por nicotina fue mucho menor en presencia de los antagonistas de receptores

nicotínicos. En otros astrocitos ($n = 7$), la nicotina únicamente generó respuestas en ausencia de los antagonistas de receptores nicotínicos (Figura 15B). También hubo astrocitos ($n = 31$) en los que la nicotina no generó respuesta en las dos condiciones experimentales (Figura 15C). Debido a que en los registros electrofisiológicos, el tetraetilamonio, que inhibe canales de potasio, ejerció efectos muy parecidos a los de la nicotina en algunos astrocitos (Figura 10E, F), examinamos su efecto en la $[Ca^{2+}]_i$. De 33 astrocitos ($n = 3$ cultivos) a los que se aplicó 20 mM de tetraetilamonio, 10 respondieron con un aumento de la fluorescencia de $86 \pm 15 \%$ (Figura 15D).

Estos resultados revelan que la nicotina, en presencia de una mezcla de antagonistas de receptores nicotínicos, produce aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos de hipocampo. Estas respuestas se deben a un mecanismo en el que no participan los receptores nicotínicos, ya que fueron bloqueados. En las mismas condiciones experimentales, la nicotina inhibió una corriente potasio (Figura 9-11), por lo que es probable que este efecto genere a su vez el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. Además, el tetraetilamonio también produjo aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos de hipocampo, sugiriendo fuertemente que el bloqueo por nicotina o tetraetilamonio de la corriente de potasio en los astrocitos genera aumento de la $[Ca^{2+}]_i$.

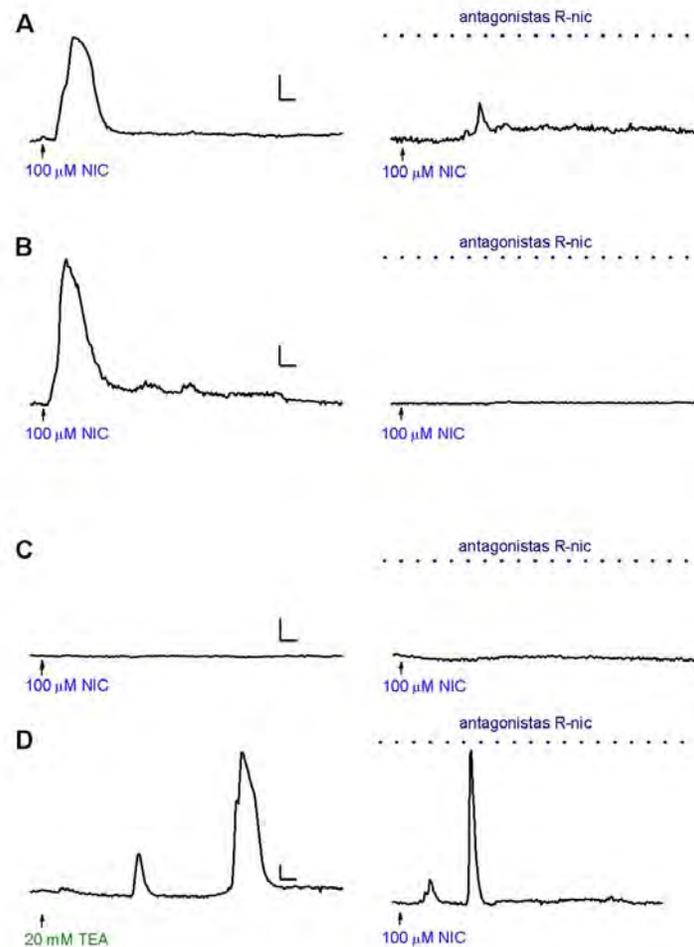


Figura 15. Aumento de la concentración de calcio intracelular por nicotina en presencia de antagonistas de receptores nicotínicos y por tetraetilamonio. (A-C) Aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ generado por nicotina en ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) de la mezcla de antagonistas de receptores nicotínicos. **(D)** Aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ generado por tetraetilamonio (izquierda) y por nicotina (derecha). Los registros fueron de cuatro astrocitos. Barra horizontal = 25 s, barra vertical = 20% $\Delta F/F_0$ (A) y 40% $\Delta F/F_0$ (B, C, D). La presencia de los antagonistas de receptores nicotínicos está indicada por la línea punteada.

En los registros electrofisiológicos encontramos que concentraciones bajas de nicotina (100 nM), por tiempos prolongados de hasta 15 min, en presencia de una mezcla de antagonistas de receptores nicotínicos, inhibió las corrientes de potasio de los astrocitos (Figura 11). A continuación, examinamos en astrocitos de hipocampo los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ generados por la aplicación de 100 nM de nicotina por 15 min. En 19 de 32 astrocitos la nicotina produjo aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$, cuya respuesta promedio fue $92 \pm 11\% \Delta F/F_0$ (Figura 16). En algunos astrocitos ($n = 5$) la respuesta generada por la nicotina fue rápida y transitoria. En otros astrocitos ($n = 9$) la respuesta fue gradual y se mantuvo hasta el final de la aplicación de la nicotina. También se observaron astrocitos ($n = 5$) que tuvieron varias respuestas transitorias.

Estos resultados indican que la inhibición de las corrientes de potasio por aplicaciones prolongadas de nicotina genera aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ en astrocitos de hipocampo.

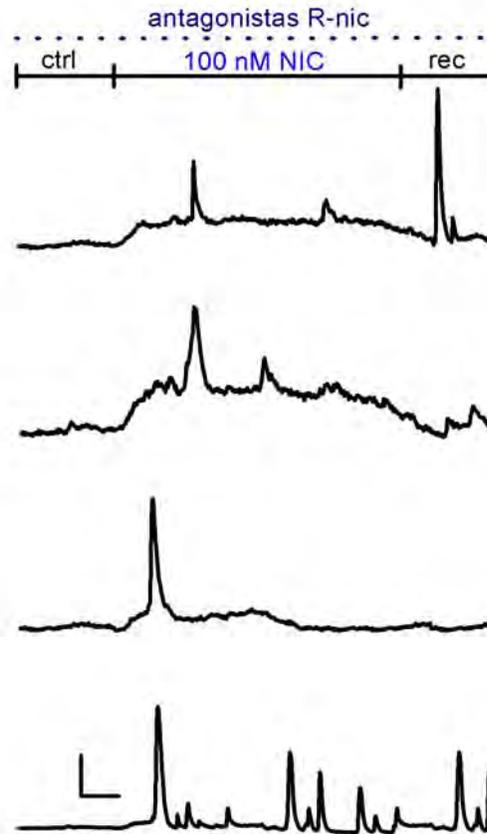


Figura 16. Aumento de la concentración de calcio intracelular con aplicaciones prolongadas de nicotina, en presencia de antagonistas de receptores nicotínicos. Incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ generados por 100 nM nicotina durante 15 min, en presencia de la mezcla de antagonistas de receptores nicotínicos. Los registros son de cuatro astrocitos. Barra horizontal = 3 min, barra vertical = 30 % $\Delta F/F_0$ y 40 % $\Delta F/F_0$ (arriba).

CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN

Los grandes hombres son, a ratos genios; a ratos niños, y siempre incompletos.
Santiago Ramón y Cajal

En el presente trabajo describimos diferentes efectos de la nicotina en las corrientes de membrana y en la concentración de calcio intracelular de los astrocitos en cultivo de la región CA1 de hipocampo de ratas recién nacidas. En los registros electrofisiológicos, cuando la solución intracelular contenía potasio, la nicotina generó corrientes entrantes sostenidas, corrientes entrantes que decayeron, corrientes bifásicas y corrientes salientes. Aún cuando resulta interesante explorar los efectos de la nicotina en cada tipo de respuesta, en este estudio nos centramos en la corriente entrante sostenida, en la que la nicotina tuvo efectos opuestos sobre las corrientes activadas por voltaje: un aumento de la corriente entrante asociada con un aumento de la conductancia de la membrana, y una reducción de la corriente saliente asociada con una disminución de la conductancia. Esos dos efectos de la nicotina se debieron a la activación de receptores nicotínicos y a la inhibición de una corriente de potasio que no decae en el tiempo, respectivamente (Hernández-Morales y García-Colunga, 2009). Por otro lado, en los registros de la concentración de calcio intracelular, la nicotina produjo aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos y, de manera consistente con sus efectos en la corriente de membrana, las respuestas de calcio se debieron tanto a la activación de receptores nicotínicos como a la inhibición de una corriente de potasio.

Las respuestas eléctricas podrían ser el resultado, en parte, por la activación de los receptores nicotínicos por la nicotina como lo hace en neuronas hipocampales (Alkondon y Albuquerque, 1993) y como lo hace la acetilcolina en astrocitos de

hipocampo (Sharma y Vijayaraghavan, 2001). En un grupo de experimentos en los cuales la solución intracelular contenía cesio, para bloquear la corriente de potasio, la nicotina generó respuestas mediadas por receptores nicotínicos en el 36% de los astrocitos. La proporción de astrocitos que respondieron aquí se encuentra en la misma proporción de astrocitos de la región CA1 de hipocampo (17.7 a 71.6%), de diferentes cepas de ratón, que unieron el anticuerpo dirigido contra la subunidad de receptores nicotínicos $\alpha 4$ (Gahring et al., 2004a,b).

Por otra parte, las corrientes entrantes y salientes generadas por nicotina en los astrocitos hipocampales corresponden a una despolarización y a una hiperpolarización, respectivamente. El efecto más típico de la nicotina es la despolarización de la célula blanco debido a la activación de receptores nicotínicos (Arneric et al., 2007; Dani y Bertrand, 2007; Douglas et al., 1967). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que agonistas de receptores nicotínicos también producen hiperpolarización de la membrana (Sorenson y Gallagher, 1996; Wong y Gallagher, 1989).

El soma de los astrocitos tiene un diámetro de 7-9 μm , y sus ramificaciones pueden ocupar un espacio de $\sim 66,000 \mu\text{m}^3$. Además, las ramificaciones de un astrocito pueden rodear $\sim 140,000$ sinapsis (Bushong et al., 2002). Lo anterior sugiere que las ramificaciones de un astrocito podrían estar en contacto con diferentes grupos de sinapsis simultáneamente y, sin embargo, podrían interactuar de manera independiente. Lo anterior se mostró cuando la acetilcolina y el glutamato liberados por la estimulación de las fibras del alveus y de las colaterales de Schaffer, respectivamente, generaron respuestas distintas en un mismo astrocito del *stratum radiatum* de la región CA1 de hipocampo (Perea y Araque, 2005). Asimismo, los

astrocitos del cerebro expresan diferentes receptores para neurotransmisores (Schipke y Kettenmann, 2004). Esto indica que cada astrocito cuenta con los canales necesarios (receptores para neurotransmisores y canales activados por voltaje) para interactuar según el grupo de sinapsis que envuelva, lo que resulta en una población de astrocitos muy diversa. Este sentido, las diferentes respuestas producidas por la nicotina en este estudio podrían explicarse porque, los astrocitos en la región CA1 de hipocampo expresan las subunidades de receptores nicotínicos $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, y $\beta 4$ (Gahring et al., 2004a,b; Graham et al., 2003). Así, según el tipo de receptor nicotínico que exprese el astrocito será la respuesta generada por la nicotina. O bien, la localización de los astrocitos en las distintas capas de la región CA1 de hipocampo, posiblemente les proporcionen distintas propiedades funcionales.

Las corrientes salientes y bifásicas generadas por la nicotina no son efectos comunes. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que agonistas de receptores nicotínicos producen hiperpolarización de la membrana, como en las neuronas del núcleo septal dorsolateral de rata (Sorenson y Gallagher, 1996; Wong y Gallagher, 1989). Además, en células musculares de diafragma de rata, la activación de receptores nicotínicos modula la actividad de la bomba de sodio-potasio, que lleva a la hiperpolarización de la membrana, efecto bloqueado por antagonistas de receptores nicotínicos (Krivoi et al., 2006). Asimismo, en células ciliadas externas la activación de receptores nicotínicos con acetilcolina genera una despolarización de la membrana seguida de una hiperpolarización, esta última por la activación de canales de potasio activados por calcio (Housley y Asmore, 1991; Kong et al., 2006).

En este estudio, encontramos que en todos los astrocitos examinados en presencia de antagonistas de receptores nicotínicos (mecamilamina, metilcaconitina más dihidro- β -eritroidina), la nicotina inhibió una corriente de potasio que no decae en el tiempo, indicando que este efecto no es mediado por la activación de receptores nicotínicos. Así, probablemente la nicotina interactúe directamente con los canales de potasio de los astrocitos de la región CA1 de hipocampo.

En contraste con los resultados del presente estudio, en neuronas de estriado en cultivo la nicotina inhibe corrientes de potasio a través de la activación de receptores nicotínicos, ya que agonistas de receptores nicotínicos reproducen el efecto de la nicotina, mientras que antagonistas de estos receptores (dihidro- β -eritroidina) evitan su efecto (Hamon et al., 1997). Por otra parte, en células de músculo liso vascular la nicotina, con concentraciones entre 1-100 μ M, produce aumento de la corriente de potasio sensible a tetraetilamonio y, con concentraciones entre 0.3–3 mM produce disminución de la misma corriente de potasio. El primer efecto de la nicotina es mediado por un mecanismo que depende de la activación de receptores nicotínicos. El segundo efecto, al parecer, es por la interacción directa de la nicotina con canales de potasio (Tang et al., 1999). Existen otros estudios en los que la nicotina inhibe directamente corrientes de potasio en miocitos ventriculares, y canales de potasio expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, entre los que se encuentran canales que originan corrientes K_{IR} como Kir2.1 y Kir2.2 y corrientes K_A como Kv4.2 y Kv4.2 (Wang et al., 1999a,b; 2000a,b).

A pesar de que el papel de la corriente K_{DR} en células gliales es poco conocido, aproximadamente el 88% de los astrocitos de la región CA1 de hipocampo expresan

esta corriente (Sontheimer y Waxman, 1993). En células microgliales la corriente K_{DR} podría jugar un papel importante en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo (Chung et al., 1998). Además, cuando se evita la expresión de la proteína Kv1.5, que es la subunidad principal que origina la corriente K_{DR} en astrocitos de médula espinal, se inhibe su proliferación (MacFarlane y Sontheimer, 2000). En el presente trabajo, al parecer la nicotina inhibe principalmente una corriente como la K_{DR} , a potenciales de membrana entre -20 y 80 mV. Así, es probable que la nicotina pueda modular los eventos de la fisiología de los astrocitos mencionados arriba.

Además, se sabe que astrocitos de la región CA1 de hipocampo expresan subunidades de receptores nicotínicos (Gahring et al., 2004a,b; Graham et al., 2003). En el presente trabajo encontramos que la nicotina puede actuar como agonista de receptores nicotínicos en una fracción de los astrocitos hipocampales. Las respuestas eléctricas observadas fueron similares a las reportadas en neuronas, astrocitos y sistemas de expresión heterólogos (Alkondon y Albuquerque, 1993; Chávez-Noriega et al., 2000; Sharma y Vijayaraghavan, 2001).

Por otro lado, la nicotina generó incremento de la concentración de calcio intracelular en los astrocitos. Aún cuando existen dos estudios que han reportado que la nicotina genera variación de la concentración de calcio intracelular en astrocitos corticales (Delbro et al., 2009; Oikawa et al., 2005), este es el primer estudio que muestra que la nicotina genera estas respuestas en astrocitos hipocampales y que son mediadas por al menos dos mecanismos, uno que dependen de la activación de receptores nicotínicos y otro que se debe a la inhibición de una corriente de potasio.

En los astrocitos examinados en este estudio, el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ por la activación de receptores nicotínicos con nicotina (que también se examinó con los

registros eléctricos) fue corroborado con la aplicación de acetilcolina y colina, agonistas de receptores nicotínicos que produjeron incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el 79 y 74% de las células, respectivamente. Es interesante que, aún cuando la aplicación de los agonistas nicotínicos fue breve (2 s), algunas respuestas fueron prolongadas. Esto se puede deber a que la activación de receptores nicotínicos puede incrementar la $[Ca^{2+}]_i$ por diversas vías, como la entrada de calcio a través del propio receptor o bien, a través de canales de calcio dependientes de voltaje, activados por la despolarización inicial. También puede haber liberación de calcio de reservorios intracelulares, después de la entrada inicial de calcio por canales iónicos (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004). En diferentes estudios se ha encontrado que los receptores nicotínicos pueden mediar respuestas de calcio por los diferentes mecanismos, que no son necesariamente excluyentes unos de otros. En neuronas de hipocampo la activación de receptores nicotínicos $\alpha 7$ conduce a la activación de canales de calcio activados por voltaje, generando en conjunto el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ (Barrantes et al., 1995). En cambio, en astrocitos de hipocampo, la acetilcolina genera respuestas de calcio donde el principal mecanismo es la liberación de calcio de reservorios intracelulares después de la entrada de calcio a través de receptores nicotínicos $\alpha 7$ (Sharma y Vijayaraghavan, 2001).

A la fecha, no existen estudios que muestren que la inhibición de las corrientes de potasio por nicotina tenga efecto sobre la $[Ca^{2+}]_i$. Aquí, encontramos que la nicotina, en presencia de una mezcla de antagonistas de receptores nicotínicos (mecamilamina, metilcaconitina más dihidro- β -eritroidina) que mantiene bloqueados los receptores, genera incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos de la región CA1 de hipocampo. Es

muy probable que estas respuestas se deban a la inhibición de corrientes de potasio, ya que en este mismo estudio, mediante registros eléctricos, la nicotina (en presencia de antagonistas de receptores nicotínicos) inhibió una corriente de potasio que no decae en el tiempo. Son pocos los ejemplos de variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ generadas por la inhibición de corrientes de potasio. En fibroblastos en cultivo, el tetraetilamonio, que es un inhibidor de corrientes de potasio, genera aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ (Brzyska et al., 2002; Failli et al., 1996). El mecanismo por el cual la nicotina y el tetraetilamonio producen variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en la célula blanco, cuando inhiben corrientes de potasio, no ha sido explorado. Sin embargo, se sabe que el tetraetilamonio produce despolarización de la membrana debido al bloqueo de canales de potasio (Haeusler y Thorens, 1980) y es probable que la nicotina produzca un efecto similar en los astrocitos de hipocampo. Así, la despolarización generada por el tetraetilamonio o la nicotina puede a su vez producir la apertura de canales de calcio activados por voltaje, los cuales generarían el aumento de la concentración de calcio intracelular. Esto último se apoya en los hallazgos, inmunohistoquímicos y electrofisiológicos, de la presencia de canales de calcio activados por voltaje en astrocitos corticales (Burgos et al., 2007; D'Ascenzo et al., 2004; Latour et al., 2003).

Los hallazgos de presente trabajo acerca efecto de la nicotina sobre el calcio intracelular en los astrocitos, cuando actúa sobre receptores nicotínicos o sobre canales de potasio, resulta trascendental porque las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ sirven a estas células para comunicarse entre sí, y también con otros grupos celulares del sistema nervioso, incluyendo a las neuronas. En los astrocitos, puede haber oscilaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$, generadas de manera independiente de la actividad de las neuronas (Aguado et al., 2002), y también incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ generados por

agonistas (endógenos o exógenos) de receptores ionotrópicos o metabótrópicos (Araque, 2008). Aún cuando no se conocen completamente los mecanismos intracelulares que producen las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos, al parecer estas dependen principalmente de la liberación de calcio de los reservorios intracelulares. Por ejemplo, los receptores metabotrópicos astrocíticos están acoplados a proteínas G, que después de su activación estimulan a la fosfolipasa C para formar el inositol-1,4,5-trifosfato, que a través de la liberación de calcio de reservorios intracelulares sensibles a inositol-1,4,5-trifosfato, incrementan la $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos (Fiacco y McCarthy, 2006). Por otro lado, la activación de receptores ionotrópicos astrocíticos puede dejar pasar calcio directamente a través del propio receptor (por ejemplo, receptores nicotínicos) que a su vez produce liberación de calcio de reservorios intracelulares (Sharma y Vijayaraghavan, 2001).

Los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos podrían tener consecuencias fisiológicas muy diversas; sin embargo, la más conocida es la liberación de transmisores como glutamato, trifosfato de adenosina y D-serina (Halassa et al., 2007; Jourdain et al., 2007; Miller, 2004; Perea y Araque, 2007). Cuando en los astrocitos la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta de ~80 nM a ~140 nM, hay liberación del transmisor glutamato, el cual actúa en los receptores de la neuronas adyacentes. Asimismo, en los astrocitos la aplicación exógena de glutamato, norepinefrina y dopamina produce un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ de 2 μ M, 1.8 μ M y 3.5 μ M, respectivamente (Parpura y Haydon, 2000). Otros estudios han mostrado que la estimulación de fibras nerviosas en el cerebelo, produce en la glía de Bergmann aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ de ~200 nM (Kulik et al., 1999). Lo anterior sugiere fuertemente que los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos son muy

importantes para ejercer sus funciones en el sistema nervioso, y debido a que la nicotina es capaz de generar incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ en estas células, podría modular las funciones mencionadas arriba.

Interesantemente, en este estudio encontramos que una exposición prolongada (15 min) de 100 nM nicotina inhibe ~43% las corrientes de potasio en los astrocitos. Un porcentaje muy parecido que el producido por la aplicación aguda de 1 mM nicotina (una concentración que es poco probable se pueda alcanzar en el cerebro de los fumadores), que inhibe las corrientes de potasio astrocíticas en ~41%. En este mismo sentido, la exposición de 100 nM nicotina por 15 min generó incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, en una proporción similar a la producida por 1 mM nicotina aplicada de manera aguda (85 y 92% de aumento de fluorescencia del fluo-4, respectivamente). Estos resultados podrían ser relevantes considerando que en un fumador regular, la concentración de la nicotina en la sangre se encuentra entre 60-300 nM, y la vida media es cercana a 2 h (Le Houezec, 2003; Benowitz, 2008). Así, resulta importante considerar que la nicotina, a las concentraciones encontradas en fumadores, además de activar receptores nicotínicos, genere sus efectos tanto en las corrientes de potasio como en la $[Ca^{2+}]_i$ de los astrocitos de hipocampo.

Aún cuando se requieren más estudios fisiológicos y farmacológicos para comprender el papel de la nicotina y la presencia de diferentes subtipos de receptores nicotínicos en las células gliales, los resultados del presente estudio pueden contribuir a entender mejor la función de los astrocitos, la participación de los receptores nicotínicos, así como los efectos de la nicotina en el hipocampo y en el cerebro en general.

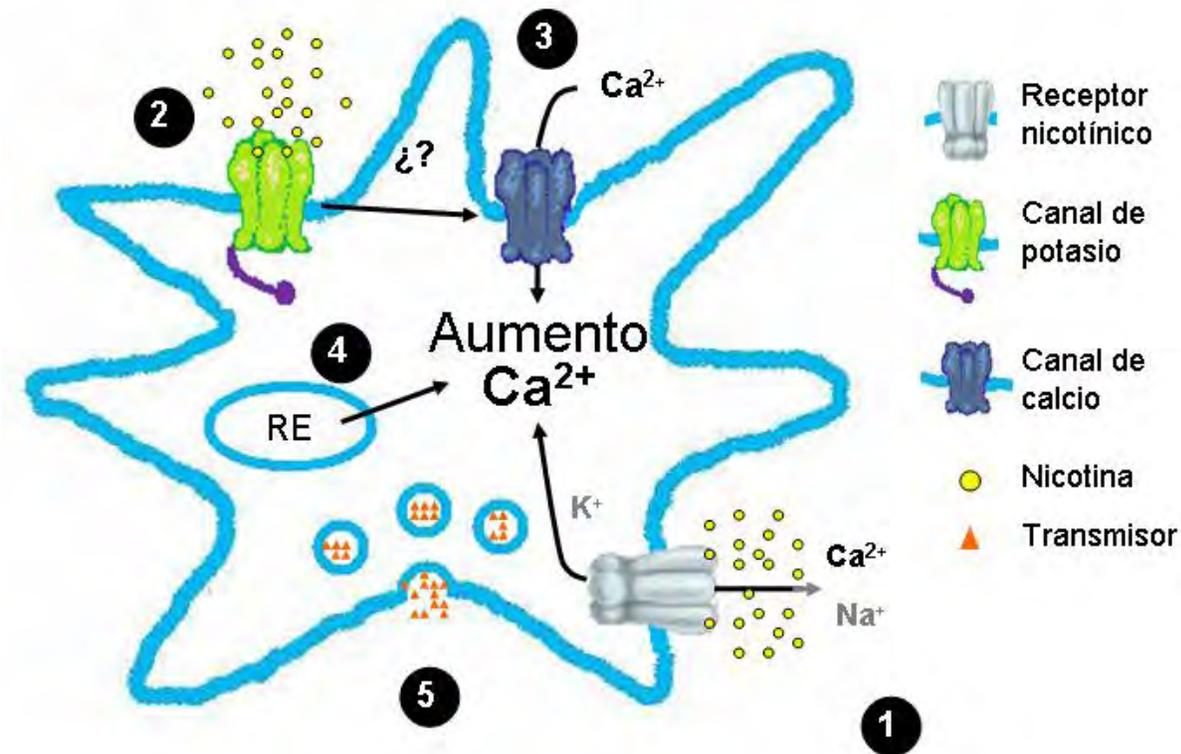


Figura 17. Esquema que representa los efectos de la nicotina en los astrocitos de hipocampo. La nicotina puede activar receptores nicotínicos (1) y, también inhibir, por su interacción directa con los canales de potasio (2), una corriente de potasio (Hernández-Morales y García-Colunga, 2009). (3) Es posible que la inhibición de canales de potasio genere despolarización de la membrana, y después la activación de canales de calcio activados por voltaje. (4) El mecanismo principal de aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en los astrocitos es la liberación de calcio de los reservorios intracelulares, posterior a la entrada de calcio extracelular o bien, la activación de vías de segundos mensajeros (Fiacco y McCarthy, 2006). (5) En los astrocitos, una consecuencia fisiológica del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ es la liberación de transmisores como glutamato, trifosfato de adenosina y D-serina (Fellin et al., 2006b; Halassa et al., 2007; Jourdain et al., 2007; Miller, 2004; Perea y Araque, 2007).

CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES

Every man's life ends the same way. It is only the details of how he lived and how he died that distinguish one man from another.
Ernest Hemingway

El presente estudio muestra diferentes efectos de la nicotina en astrocitos en cultivo de la región CA1 de hipocampo de rata: (1) activación de receptores nicotínicos, (2) inhibición de corrientes de potasio, o (3) la combinación de ambos efectos en la misma célula, y que corresponden a una despolarización del astrocito. Interesantemente, los efectos de la nicotina, observados en el presente estudio, resultan en un aumento de la concentración de calcio libre intracelular.

Una implicación directa de los resultados obtenidos en este estudio es que la respuesta generada por la nicotina en un astrocito podría llevar a la generación de ondas de calcio que pueden propagarse a los astrocitos vecinos, liberación de transmisores, y modulación de la transmisión sináptica (Araque et al., 2002; Halassa et al., 2007; Jourdain et al., 2007; Perea y Araque, 2007).

Es este sentido, es importante considerar la complejidad de los efectos de la nicotina en las funciones y disfunciones del cerebro, ya que se sabe tiene efectos sobre los receptores nicotínicos, que pueden estar o no en la región sináptica (Dani y Bertrand, 2007; Gotti et al., 2006; Levin et al., 2006) y en el presente trabajo se muestra que también puede tener efectos en los astrocitos de hipocampo.

APÉNDICE 1: ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS

Los receptores de acetilcolina de tipo nicotínico son proteínas de membrana formadas por cinco cadenas polipeptídicas (subunidades) arregladas alrededor de un poro central con su eje perpendicular a la membrana. En el sistema nervioso se han encontrado 10 subunidades de receptores nicotínicos, siete α ($\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$) y tres β ($\beta 2$ - $\beta 4$). Las subunidades que forman los receptores nicotínicos tienen tres dominios: el extracelular e intracelular hidrofílicos y el transmembranal hidrofóbico. En la región extracelular de cada una de las subunidades se localizan las terminales carboxilo y amino. En esta última se encuentra un asa que está delimitada por un par de cisteínas unidas con un puente disulfuro (característica de los receptores ionotrópicos) y también el sitio de unión al ligando, que es una región que se forma en la interfase entre dos subunidades adyacentes. Algunas subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$) aportan al sitio de unión al ligando un par de cisteínas que son esenciales para la unión del ligando. Otras subunidades ($\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 4$) contribuyen al sitio de unión al ligando con tres aminoácidos, principalmente la leucina, la metionina y el triptofano (Figura 18A-C). Las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 3$ no participan directamente en la formación del sitio de unión al ligando. Es importante señalar que los agonistas y antagonistas competitivos (nicotina, epibatidina, anatoxina metilicaconitina y la α -conotoxina) se unen al receptor nicotínico en el sitio de unión al ligando descrito arriba (Figura 18D); sin embargo, las subunidades que forman un receptor nicotínico determinan la afinidad y la selectividad al ligando. Por ejemplo, en el sistema nervioso central el receptor nicotínico que tienen las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$

une con mayor afinidad a la nicotina con respecto a otros subtipos de receptores (Albuquerque et al., 2009).

Por otro lado, la región transmembranal del receptor nicotínico comprende cuatro dominios (M1-M4); el dominio M2 de cada subunidad forma la mayor parte del poro transmembranal y en la porción final del lado plasmático contiene la compuerta del canal. El dominio intracelular de las subunidades de los receptores nicotínicos está formado por dos segmentos, uno corto que une a M1 con M2, y uno mayor que une los segmentos M3 y M4 (Figura 18A, B; Unwin, 2005). En estos segmentos se han encontrado sitios de fosforilación que pueden ser modulados por señales intracelulares y la mayoría de estos sitios se localizan en el segmento mayor (Swope et al., 1999). Se han sugerido funciones importantes para los segmentos intracelulares en la desensibilización de los receptores (Vijayaraghavan et al., 1990) y en la regulación de la expresión de receptores nicotínicos funcionales (López-Hernández et al., 2009).

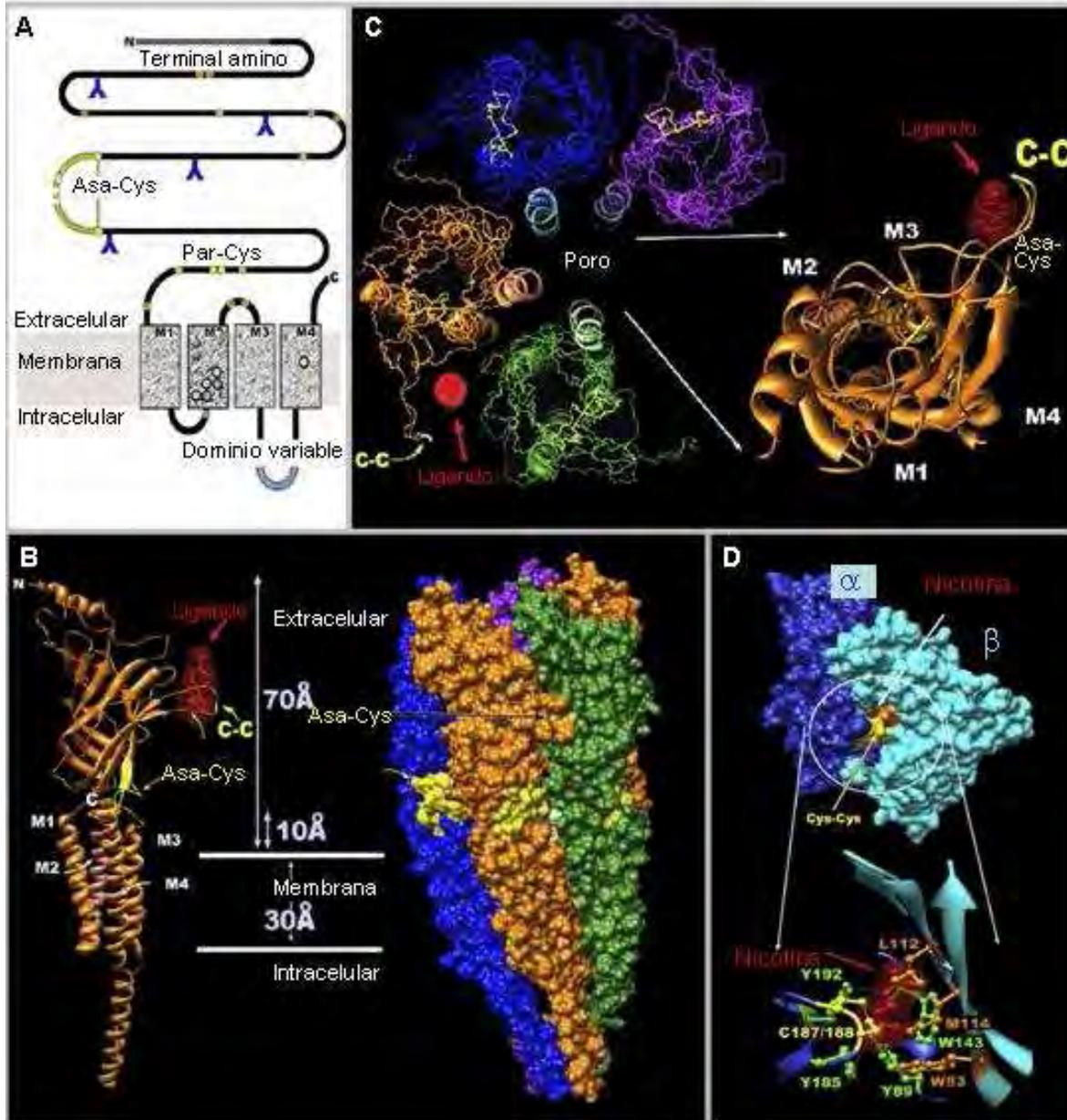


Figura 18. Estructura de los receptores de acetilcolina de tipo nicotínico. (A) Representación esquemática de la cadena polipeptídica de una subunidad de receptores nicotínicos. Se indica el asa de cisteínas (asa-Cys) y el par de cisteínas (Cys-Cys). (B) Representación tridimensional de la estructura de una subunidad α (izquierda) y un receptor nicotínico (derecha). En ambos casos, se indica el tamaño aproximado de las regiones y el asa de cisteínas. (C) Representación de un receptor nicotínico visto desde la parte extracelular. A la derecha, en una magnificación mayor, el sitio de unión al ligando de una subunidad α con el ligando unido. (D) Representación de una subunidad α y una β adyacentes en cuya interfase (sitio de unión al ligando) se encuentra unida la nicotina (arriba). También se indican los aminoácidos que participan en la unión de la nicotina (abajo) (tomado de Albuquerque et al., 2003).

APÉNDICE 2: ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS CANALES DE POTASIO

Los canales de potasio son proteínas de membrana, formados por subunidades α y subunidades β . Las propiedades de un canal de potasio están determinadas por las subunidades que los constituyen. Los canales de potasio se han agrupado en diferentes familias: a) canales de potasio de rectificación entrante, b) canales de potasio activados por voltaje, c) canales de potasio activados por calcio, y d) canales de potasio con dos dominios que forman el poro (Pischalnikova y Sokolova, 2009).

Los canales de potasio se encuentran distribuidos ampliamente en el sistema nervioso central (Hille, 2001). La función principal de estos canales es modular las propiedades eléctricas de las membranas; por ejemplo, mantienen el potencial de membrana en reposo, modulan la repolarización de la membrana después de disparos de potenciales de acción, controlan la frecuencia de disparo de potenciales de acción, entre otros. Las subunidades que constituyen estos canales están formadas por seis segmentos transmembranales (S1 a S6). El dominio responsable de detectar el voltaje de la membrana es el S4, mientras que los dominios que forman el poro del canal son el S5 y el S6. Asimismo, el segmento S6 forma parte del filtro de selectividad, que es el responsable de que el ión potasio pase a través del poro, con una relación 1000 a 1 respecto al sodio. Además, en la parte amino terminal, localizada intracelularmente por debajo del canal del poro, se encuentra el dominio T1, que participa en el ensamblaje de las subunidades α y en la unión de las subunidades β (Figura 19; Ahern y Kobertz, 2009; Pischalnikova y Sokolova, 2009).

La corriente iónica que pasa a través de los canales de potasio puede ser bloqueada por agentes externos. En este sentido, el mecanismo de inhibición más

común es por bloqueo mecánico del poro por donde pasan los iones potasio. El tetraetilamonio (Figura 19B), que es una amina cuaternaria, es usado frecuentemente como bloqueador de canales de potasio. Éste se une a los canales de potasio, al parecer en dos regiones cercanas al poro, en la región extracelular (Figura 19D) e intracelular (Ahern y Kobertz, 2009; Bisset y Chung, 2008).

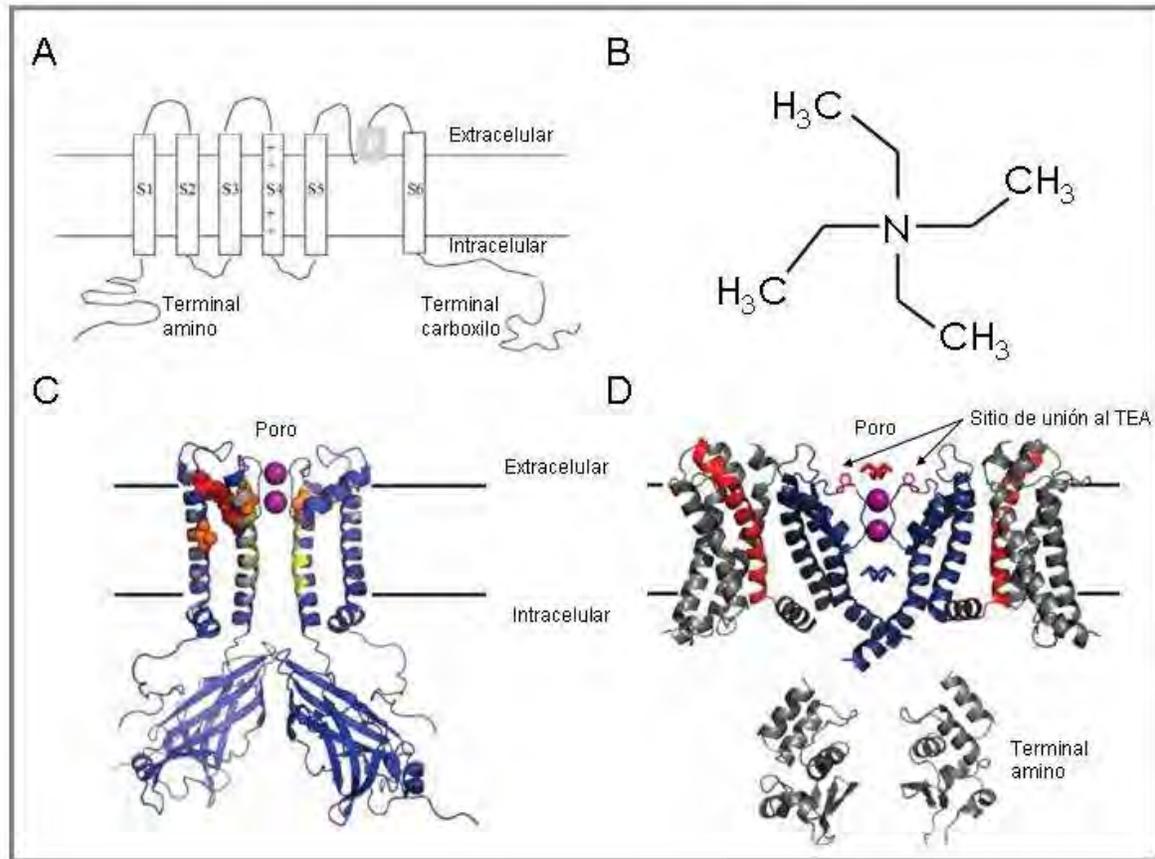


Figura 19. Estructura de canales de potasio, activados por voltaje, y de rectificación entrante. (A) Representación esquemática de la subunidad de un canal de potasio activado por voltaje. Se indican las regiones transmembranales (S1-S6), el segmento que forma parte del poro conductor de iones (P), y las terminales amino y carboxilo. En el segmento S4 se encuentra el detector de voltaje (+). (B) Estructura química del tetraetilamonio. Representaciones tridimensionales de un canal de potasio de rectificación entrante (C) y un canal de potasio activado por voltaje (D). La vista de los canales es lateral, y se aprecian dos de las cuatro subunidades que forman el canal para efectos de claridad. Las líneas horizontales señalan las superficies de la membrana plasmática mientras que, los círculos morados a los iones potasio que pasan a través del poro. En el canal de potasio activado por voltaje también se indican los sitios de unión para el tetraetilamonio (TEA) (tomado de Ahern y Kobertz, 2009; Pischalnikova y Sokolova, 2009).

APÉNDICE 3: ARTÍCULO PUBLICADO

Neuropharmacology 56 (2009) 975–983



Contents lists available at ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharmEffects of nicotine on K^+ currents and nicotinic receptors in astrocytes of the hippocampal CA1 region

Miriam Hernández-Morales, Jesús García-Colunga*

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla, Querétaro 76230, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 July 2008

Received in revised form

14 January 2009

Accepted 29 January 2009

Keywords:

Glial cells

Hippocampus

Nicotinic acetylcholine receptors

Potassium current

Astrocytes

ABSTRACT

Nicotine, the main addictive substance in tobacco, interacts with muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) that are also localized in astrocytes. We studied electrical effects elicited by nicotine in cultured astrocytes from the CA1 area of the rat hippocampus. Nicotine elicited different types of responses: sustained inward currents, decaying inward currents, and biphasic responses (an outward, followed by an inward current). Nicotine showed two opposite effects, an increase or a decrease of astrocyte membrane conductance, when voltage ramps were applied during sustained inward currents. The former was isolated by blocking K^+ currents with Cs^+ and was inhibited by mecamylamine. The latter was mimicked by tetraethylammonium ion, and was obtained in the presence of nAChR antagonists (mecamylamine, methyllycaconitine plus dihydro- β -erythroidine). Thus, these results indicate that nicotine activates nAChRs and directly inhibits K^+ currents in cultured astrocytes from the CA1 region of the rat hippocampus.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nicotine is the main substance responsible for tobacco dependence. Nicotine actions improve cognitive functions such as attention, learning, and memory and are also involved in certain pathologies, including Parkinson's and Alzheimer's diseases, schizophrenia, anxiety, and depression (Jensen et al., 2005; Le Houezec, 2003; Levin et al., 2006). All of these effects seem to be mediated by nicotine acting on nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in several brain areas (Gotti et al., 2006; Mansvelder et al., 2006).

The nAChRs are ligand-gated cation channels endogenously activated by acetylcholine. They are pentameric proteins composed of distinct subunits ($\alpha 2$ – $\alpha 10$ and $\beta 2$ – $\beta 4$) and are widely distributed in the brain. Each nAChR subtype has different biophysical and pharmacological properties, depending on its subunit composition (Jensen et al., 2005). Activation of nAChRs allows the movement of Na^+ , K^+ , and Ca^{2+} across the cell membrane, resulting in a depolarizing response, whereas long exposure to the agonist desensitizes a fraction of nAChRs. The diverse functions and locations of nAChR subtypes underlie their modulating roles throughout the brain. Thus, presynaptic nAChRs modulate neurotransmitter release, postsynaptic nAChRs participate in fast excitatory transmission, and non-synaptic nAChRs interfere with many neurotransmitter

systems by influencing neuronal excitability (Dani and Bertrand, 2007; Gotti et al., 2006).

Interestingly, nicotine also interacts at sites different from nAChRs, inhibiting voltage-gated K^+ channels (delayed-rectifying, inward-rectifying, and transient A-type channels) in ventricular myocytes, arterial smooth muscle cells, and heterologous expression systems. In these studies nicotine blocked K^+ currents, without activating nAChRs, by interacting directly with K^+ channels (Sato, 2002; Tang et al., 1999; Wang et al., 1999a,b, 2000a,b).

On the other hand, nicotine produced membrane hyperpolarization, depolarization, or both effects in spinal cord astrocytes (Hösli et al., 1988). Furthermore, in cortical astrocytes, nicotine increased the intracellular Ca^{2+} concentration, and the increase was partially inhibited by the nAChR antagonists dihydro- β -erythroidine and methyllycaconitine (Oikawa et al., 2005). Although there are few studies on the effects of nicotine on astrocytes, they show different types of responses. For this reason, in the present work we studied two possible effects of nicotine in cultured astrocytes from the CA1 area of the rat hippocampus, activation of nAChRs and blockade of K^+ currents. Part of these results has been reported in abstract form (Hernández-Morales and García-Colunga, 2007).

2. Materials and methods

2.1. Astrocyte cultures

Every effort was made to minimize suffering and the number of animals used in all experiments. The animal experiments were approved by the ethical policies for

* Corresponding author. Tel./fax: +52 442 238 1063.

E-mail address: garcia@inb.unam.mx (J. García-Colunga).

animal care and handling of the Universidad Nacional Autónoma de México. Astrocyte cultures were obtained as previously described (Montiel-Herrera et al., 2006; Reyes-Haro et al., 2005). Two newborn Wistar rats were decapitated and pithead. The brains were immediately removed and placed in a Petri dish containing cold control solution (see the section on Electrophysiological recordings). Brain slices were then obtained to dissect the hippocampus. Small pieces of the hippocampal CA1 area were cut using sharp needles. The pieces of tissue were placed in a 2-mL Eppendorf tube with control solution and passed several times through a Pasteur pipette to mechanically dissociate the cells. The suspension of cells was placed in a 35-mm Petri dish on a glass coverslip coated with 0.01% poly-L-ornithine. Then, we added 2 mL Dulbecco's Modified Eagles Medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 11 mg/mL sodium pyruvate, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. To select for astrocytes, after 24 h of culture, the Dulbecco's Modified Eagles Medium was replaced by serum-free neurobasal medium with 2 mM glutamine, 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and G5 supplement. The medium was changed every four days. All culture reagents were purchased from Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA).

2.2. Immunocytochemical assay

After 4–7 days in culture, cells were rinsed twice with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), fixed with 100% methanol for 10 min at -20°C , rinsed three times with PBS, and kept for 1 h at room temperature in PBS containing 0.1% Triton X-100 plus 10% horse serum. Then, cell cultures were incubated overnight at 4°C with a primary rabbit polyclonal antibody directed against glial fibrillary acidic protein (GFAP; Diasorin, Stillwater, MN, USA) diluted 1:10 in PBS. The cells were then washed three times with PBS and incubated for 1 h at room temperature with a secondary, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat antibody raised against rabbit IgG (Sigma, St. Louis MO, USA) at a dilution 1:250. Finally, coverslips were washed three times with PBS and mounted with glycerol. Cells were visualized with epifluorescence microscopy to determine the percent of immunoreactive cells. Images were digitalized with a monochromatic camera and edited with commercial software. In control experiments, cells were treated with the secondary antibody alone and did not fluoresce significantly.

2.3. Electrophysiological recordings

Membrane currents were recorded using the whole-cell voltage-clamp technique (Hamill et al., 1981). A fragment of coverslip, on which astrocytes had been cultured for 4–7 days, was placed in a recording chamber ($\sim 200\ \mu\text{L}$) on the stage of an inverted microscope (Olympus IX-70, Japan). The recording chamber was continuously superfused (4 mL/min) with control solution containing (in mM): 136 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 10 HEPES, and 10 D-glucose, pH adjusted to 7.4 with NaOH. Recording pipettes were made with borosilicate capillaries using a Sutter P-97 micropipette puller (Sutter Instruments, CA, USA). Pipettes were filled with a solution containing (in mM): 130 K-gluconate, 10 NaCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 Mg-ATP, and 0.2 Na-GTP, pH adjusted to 7.2 with KOH, having resistance of 3–5 M Ω . In one set of experiments, pipettes were filled with a solution containing (in mM): 80 CsCl, 80 CsF, 10 EGTA, and 10 HEPES, pH adjusted to 7.2 with CsOH. All experiments were carried out at room temperature (20–23 $^{\circ}\text{C}$). Transient capacitive and leak currents were electronically and digitally subtracted. The currents were recorded with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, CA, USA), filtered at 5 kHz, and digitized at 100 Hz (for currents generated by nicotine), 3.3 kHz (for voltage pulses), or 0.5 kHz (for voltage ramps). The data were analyzed with pClamp 8.2 (Axon Instruments, CA, USA) and Microcal Origin 7 (OriginLab, MA, USA) software. The data are given as mean \pm standard error. Comparisons of the mean values among groups were performed by the Student's *t*-test, where $P < 0.05$ was taken to indicate a statistically significant difference.

2.4. Drugs

The drugs used were 4-aminopyridine, mecamylamine hydrochloride (Tocris Ellisville, MO, USA), acetylcholine chloride, atropine, dihydro- β -erythroidine hydrobromide, (–)-nicotine hydrogen tartrate salt, methyllycaconitine citrate hydrate, and tetraethylammonium chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The drugs were prepared as concentrated stocks in distilled water and stored frozen. On the day of use, drugs were diluted in control solution and applied in the bath superfusion fluid by gravity.

3. Results

Within a single study there are different and opposite effects induced by nicotine, either a hyperpolarization or a depolarization of astrocytes from the spinal cord, both mediated by activation of nAChRs (Höslí et al., 1988). To date there are few studies related to effects of nicotine on astrocytes (Höslí et al., 1988; Oikawa et al.,

2005). Therefore, we explored the effects of nicotine on membrane currents in astrocytes from the CA1 area of the hippocampus.

Confluent cell cultures ($n = 5$) were immunolabeled with an antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP), and more than 99% of the cells were positive, indicating their astrocyte lineage (Fig. 1A and B). The cells were also identified as astrocytes according to morphological and electrophysiological criteria. They have an irregular cell body (from rounded to oval) with branching processes and, like hippocampal astrocytes *in situ* (Araque et al., 2002; Bushong et al., 2002), they present neither rapid Na⁺ currents nor action potentials.

3.1. Nicotine induces different electrical responses in astrocytes

For recording purposes we used completely isolated astrocytes after 4–7 days in culture, i.e., with no neighboring cells. Of 180 astrocytes, 76 responded to the application of 1 mM nicotine. Interestingly, these cells showed different types of responses. Thus, nicotine generated a sustained inward current in 33 astrocytes with amplitude of $223 \pm 32\ \text{pA}$ (Fig. 1C, $n = 33$). In 11 astrocytes, nicotine induced an inward current that decayed in the continuous presence of nicotine, and the amplitude was highly variable, between 31 and 957 pA (Fig. 1D, $n = 11$). On the other hand, nicotine induced biphasic responses in 25 cells, an outward current ($94 \pm 25\ \text{pA}$) followed by an inward current ($140 \pm 22\ \text{pA}$) (Fig. 1E, $n = 25$). Finally, in a few astrocytes nicotine induced an outward current (data not shown), with amplitude between 41 and 1051 pA ($n = 7$). In all cases the current returned to its basal level after nicotine was removed. Hippocampal astrocytes responded to concentrations of nicotine as low as 1 μM ; an example of a response to 10 μM nicotine is shown in Fig. 1D (inset; $56 \pm 20\ \text{pA}$, $n = 8$).

It is important to note that no correlation was observed between the day of culture of the astrocytes (4–7 days) and the type of response induced by nicotine. Furthermore, the diverse responses induced by nicotine were observed in different astrocytes from the same cell culture. In addition, the different responses were independent of the nicotine concentration, and successive nicotine applications on one astrocyte evoked the same type of response (data not shown).

3.2. Opposite effects of nicotine on hippocampal astrocytes

Although nicotine elicited a variety of responses, including sustained and transient inward currents, outward currents, and biphasic currents, we focused on sustained inward currents, because these were the majority (43% of the responding astrocytes), and because of the possible relevance of such effect, in which a depolarization of an *in situ* astrocyte may lead to an increase of the intracellular Ca²⁺ concentration and then to the release of a transmitter that modulates neuronal activity (Jourdain et al., 2007; Pappas et al., 1994).

To examine nicotine effects on voltage-dependent currents, current–voltage (*I*–*V*) relationships were obtained by applying 1-s voltage ramps (from -120 to $80\ \text{mV}$) before and during the nicotine-induced, sustained inward current (Fig. 2A and B; vertical lines a–d). In 9 of 32 cells, the current generated by voltage ramp during the nicotine response showed an increase of the inward current and, to a lesser extent, an increase of the outward current, both as compared with the control (Fig. 2Ca and b). In this type of responses, the reversal potential of the *I*–*V* relationship during nicotine-induced current was displaced to positive voltages with respect to the control *I*–*V* relationship. In addition, the slope of the *I*–*V* relationship, which corresponds to the membrane conductance, increased at negative voltages compared with the control *I*–*V* relationship.

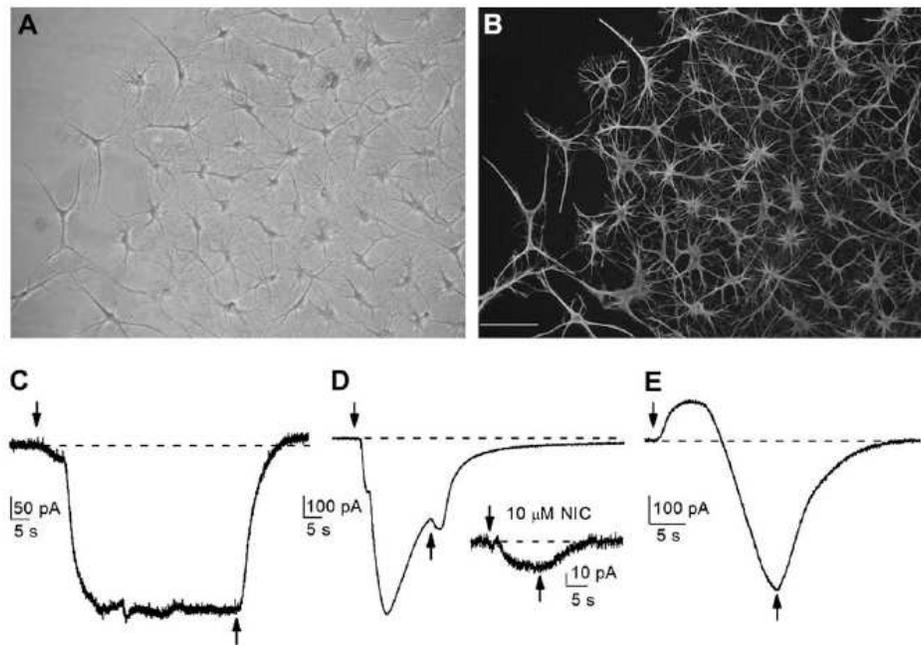


Fig. 1. Different responses elicited by nicotine in hippocampal astrocytes. (A) Phase-contrast image of astrocytes from the CA1 area of the hippocampus after seven days in culture. (B) Same field as in (A) with fluorescence microscopy. Astrocytes were immunolabeled with an antibody against GFAP. Scale bar = 100 μm . (C–E) Examples of ion currents induced by 1 mM and 10 μM nicotine (NIC) in four different astrocytes. Unless other was stated, the holding potential was -60 mV. In this and the following figures arrows indicate the timing of nicotine application, and dashed lines correspond to the basal current level.

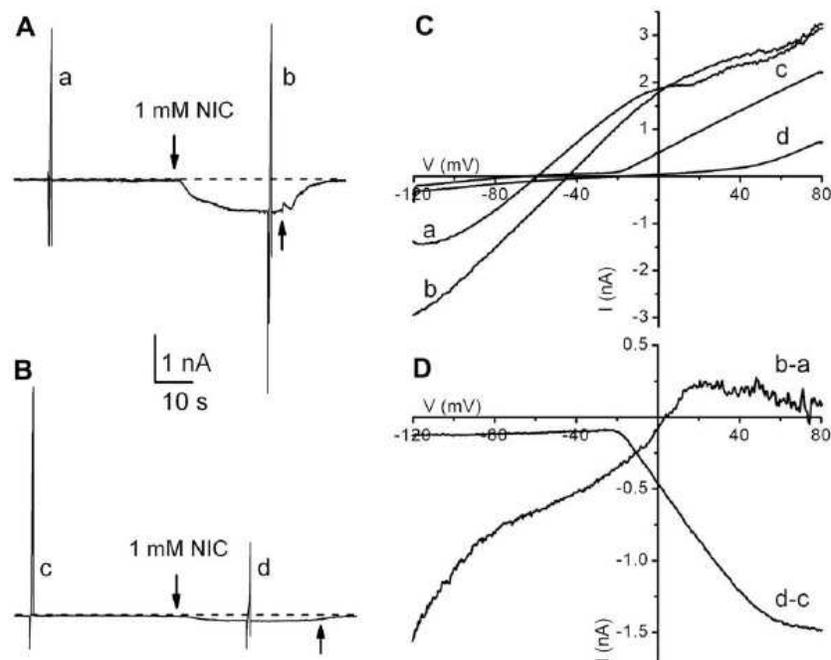


Fig. 2. *I*-*V* relationships of nicotine-induced, sustained inward currents. (A, B) Nicotine-induced, sustained inward currents recorded from two cultured hippocampal astrocytes. Vertical lines (a–d) correspond to membrane currents in response to a voltage ramp (see text) from a holding potential of -60 mV. (C) *I*-*V* relationships [obtained from (A) and (B)] in the control solution (a, c) and during the nicotine responses (b, d). (D) Net nicotine-induced current, obtained by subtracting the control *I*-*V* relationship from that in the presence of nicotine, from the records in (C).

On the other hand, in 23 astrocytes, the current generated by voltage ramp during nicotine responses showed a slight increase of inward current and a considerable decrease of outward current (Fig. 2Cc and d). Nicotine decreased the outward current at 80 mV by $14.6 \pm 2.4\%$ with respect to the control, and this effect was statistically significant ($n = 23$). In this representative astrocyte, the current reversed from inward to outward at about -20 mV in the presence of nicotine, whereas the control current reversed at about -60 mV. Additionally, the slopes of I - V relationship between -120 and -20 mV were similar in both control and nicotine conditions. Furthermore, in this type of response, the slope of the I - V relationship during nicotine response was less than that of the control I - V relationship at positive voltages, indicating that nicotine decreases the membrane conductance.

These two opposite effects of nicotine, an increase and a decrease of the astrocyte membrane conductance, are reflected in the net I - V relationships for nicotine responses (Fig. 2D). In the former case, the I - V relationship had an inward rectification, i.e., the slope of the I - V relation between -120 and 20 mV is higher than that at more positive voltages (Fig. 2D, b-a), and the reversal potential was -6 ± 1.3 mV ($n = 9$). These properties of the I - V relation are similar to those of nAChRs in hippocampal neurons (Alkondon and Albuquerque, 1993), strongly suggesting that nicotine also activates nAChRs in hippocampal astrocytes. In the latter case, the net I - V relationship for the nicotine response had a negative slope between -20 and 80 mV, that indicates the magnitude of the inhibited current over the voltage range tested (Fig. 2D, d-c), suggesting that nicotine inhibited an ion current in these astrocytes. Furthermore, it had a small inward current between -120 and -20 mV.

Accordingly, the fact that nicotine generates a sustained inward current is probably attributable to activation of nAChRs, inhibition of ion currents, or the combination of both effects, resulting in complex I - V relationships.

3.3. Inhibition of ion currents by nicotine

A few reports show direct and inhibitory effects of nicotine on the activity of voltage-gated ion channels in ventricular myocytes, arterial smooth muscle cells, and trigeminal ganglion neurons (Liu et al., 2004; Satoh, 2002; Tang et al., 1999; Wang et al., 1999a,b, 2000a,b). However, there are no studies of nicotine effects on ion currents in astrocytes. To address this issue, we eliminated the contribution of nAChRs to ensure that the effect of nicotine is directly on ion currents. This was performed by superfusing hippocampal astrocytes, for at least 10 min before nicotine application, with $100 \mu\text{M}$ mecamylamine (a non-selective nAChR antagonist; Papke et al., 2001), 10 nM methyllycaconitine (a selective antagonist for $\alpha 7$ -containing nAChRs; Dwsoskin and Crooks, 2001), and 10 nM dihydro- β -erythroidine (a selective antagonist for $\alpha 4\beta 2$ nAChRs; Dwsoskin and Crooks, 2001).

Under these conditions, we applied 200-ms voltage pulses, from -120 to 80 mV, before and during the nicotine response. Voltage pulses generated inward and outward currents in control conditions (Fig. 3A₁). Even though the cocktail of nAChR antagonists blocked nAChRs, nicotine considerably reduced the outward currents in all astrocytes examined (Fig. 3A₂, B). At 80 mV, the voltage at which nicotine exerts the most potent inhibition (Fig. 3B), the peak outward current decreased by $29.9 \pm 6.4\%$, and the current at the end of voltage pulse decreased by $42 \pm 9.3\%$ ($n = 12$).

I - V relationships were constructed with the current magnitudes at the peak and at the end of voltage pulses (Fig. 3C and D, respectively). Small inward currents were elicited between -120 and -40 mV, and the I - V relationship slope was similar in both

control and nicotine conditions (Fig. 3C and D, squares and circles). However, nicotine drastically diminished outward currents at positive voltages, and decreased the I - V relationship slope and therefore the membrane conductance of the astrocyte. In addition, the net I - V relationship for the nicotine-induced current indicates the magnitude of the inhibited current at each potential (Fig. 3C and D triangles).

The results described above reveal that nicotine inhibits mainly outward currents in hippocampal astrocytes, and this effect is not mediated by nAChRs, strongly indicating that nicotine acts directly on ion channels.

3.4. Inhibition of K^+ currents by nicotine

Hippocampal astrocytes express three types of K^+ currents, delayed-rectifying current (K_{DR}), transient A-type current (K_A), and inward-rectifying current (K_{IR}) (Sontheimer and Waxman, 1993). Since nicotine inhibits mainly outward currents, both K_{DR} and K_A currents were activated by a protocol consisting of a hyperpolarized prepulse (-110 mV for 400 ms) and 200-ms voltage pulses from -60 to 80 mV with 20 mV increments (Connor and Stevens, 1971; Reyes-Haro et al., 2005). Astrocytes were superfused with the cocktail of nAChR antagonists (see above), and the voltage protocol was applied in the absence and presence of 1 mM nicotine.

In 12 of 20 astrocytes examined, voltage pulses generated transient and non-decaying currents with features similar to those of K_A and K_{DR} currents, respectively (Fig. 4A, ctrl). Outward currents were activated at -20 mV, with the amplitude increasing at positive voltages. In these astrocytes nicotine reduced the current amplitude with respect to the control (Fig. 4A, right). On the other hand, the nicotine-sensitive current, obtained by subtracting the current in the presence of nicotine from that in the control solution at 80 mV, did not decay during the 200-ms voltage pulse, a response similar to the K_{DR} current (Fig. 4B, inset). Fig. 4B shows I - V relationships for currents at the end of voltage pulses, in the control condition and during nicotine application. Here, nicotine reduced both the current amplitude and the slope of the I - V relationship between -20 and 80 mV, with respect to the control.

Additionally, in eight astrocytes voltage pulses generated only non-decaying outward currents that were activated at -20 mV, and gradually increased in magnitude with positive voltages (Fig. 4C, ctrl). Nicotine reduced the current amplitude (Fig. 4C, right), and the nicotine-sensitive current did not decay during the voltage pulse at 80 mV (Fig. 4D, inset). As in Fig. 4B, nicotine reduced the current amplitude and the slope of the I - V relationship with respect to the control (Fig. 4D).

Thus, in those astrocytes that displayed both transient and non-decaying currents, as well as in those that displayed only non-decaying currents, nicotine inhibited only the non-decaying K^+ current component by $43 \pm 7\%$ at 80 mV ($n = 20$), a statistically significant reduction compared with the control.

To verify that the inhibition of K^+ current is a selective effect of nicotine, in eight astrocytes we applied 1 mM acetylcholine, the endogenous agonist for nAChRs, in the continuous presence of the cocktail of nAChR antagonists and 500 nM atropine to inhibit the muscarinic component. Under these conditions acetylcholine had no effect on K^+ currents (data not shown).

To compare the nicotine inhibitory effect on K^+ currents of hippocampal astrocytes, we applied high concentrations of extracellular tetraethylammonium ion (20 mM), which inhibits most of the K^+ currents (Hille, 2001). Tetraethylammonium ion inhibits K^+ currents on astrocytes including K_{DR} current (Bordey and Sontheimer, 1997; Reyes-Haro et al., 2005), K_A current (Bekar et al., 2005), and K_{IR} current (Ransom and Sontheimer, 1995). In six

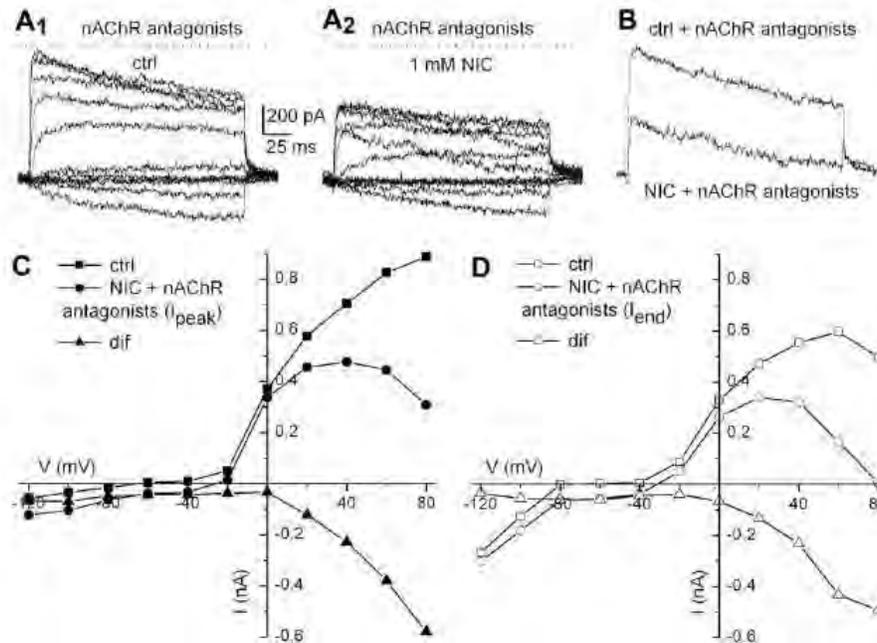


Fig. 3. Inhibition of ion currents by nicotine. Ion currents generated by voltage pulses in the continuous presence of a cocktail of nAChR antagonists: 100 μ M mecamylamine, 10 nM methylcaconitine, and 10 nM dihydro- β -erythroidine (dotted line), in the absence (A₁) and in the presence of nicotine (A₂). (B) Currents generated at 80 mV, in control and nicotine conditions, *I*-*V* relationships for peak currents (C, *I*_{peak}) and for currents at the end of voltage pulses (D, *I*_{end}) were obtained from the above records in the control condition and during nicotine response (squares and circles, respectively). Net *I*-*V* relationships of the nicotine-induced current (dif, triangles) were obtained as in Fig. 2.

astrocytes tetraethylammonium ion exerted effects similar to those of nicotine (Fig. 4E and F). The tetraethylammonium-sensitive current was maintained constant until the end of the 80 mV voltage pulse (Fig. 4F, inset).

These results show that nicotine inhibits K^+ currents in hippocampal astrocytes. Whether astrocytes exhibited both transient and non-decaying currents or just non-decaying currents, in all cases the nicotine-sensitive current was constant until the end of the 80 mV voltage pulse, like the K_{DR} current.

Next, we applied lower concentrations of nicotine (100 nM and 100 μ M) in CA1 hippocampal astrocytes. As in Fig. 4, in the continuous presence of the cocktail of nAChR antagonists, voltage pulses were applied in the control and during the application of 100 nM, 100 μ M and 1 mM nicotine. The *I*-*V* relationships show that the K^+ current was inhibited at voltages between -20 and 80 mV with respect to the control, for the three concentrations of nicotine (Fig. 5A). In addition, the *I*-*V* relationship slopes, and therefore the membrane conductance, were lesser in the presence of nicotine than in the control. A partial recovery of K^+ currents was observed after 10 min of washout nicotine. The K^+ current was inhibited by $6.2 \pm 1.5\%$ ($n = 4$) with 100 nM, $13.0 \pm 4.3\%$ ($n = 5$) with 100 μ M, and $40.6 \pm 5.9\%$ ($n = 23$) with 1 mM nicotine (Fig. 5B), although the inhibition by 100 nM nicotine was not statistically significant compared with the control.

Next, we evaluated longer applications (20 min) of 100 nM nicotine on the K^+ current activated by an 80 mV voltage pulse, in the absence and in the presence of nicotine (Fig. 5C). The inhibition was $31.5 \pm 6.7\%$ ($n = 6$) after 10 min, $42.6 \pm 9.8\%$ ($n = 5$) after 15 min, and $56.4 \pm 9.6\%$ ($n = 4$) after 20 min of nicotine exposure (Fig. 5D). A partial recovery of the K^+ current was observed after 5 min of washout nicotine. These results show that a long application of low nicotine concentrations inhibited K^+ currents in CA1 hippocampal astrocytes.

3.5. Activation of nicotinic acetylcholine receptors by nicotine

The nAChR antagonists allowed to unmask another effect of nicotine in hippocampal astrocytes, that is, inhibition of the K^+ current. Thus, to address the activation of nAChRs by nicotine, K^+ was replaced in the intracellular solution by Cs^+ , which blocks K^+ channels (Hille, 2001).

Under these conditions, four of 11 astrocytes responded to the application of 1 mM nicotine with an inward current that decayed slightly in the presence of nicotine (Fig. 6A), with amplitude that ranged from 62 to 185 pA ($n = 4$). In these cells, voltage ramps were applied before and during the nicotine response (see Fig. 2). Nicotine did not inhibit K^+ currents, i.e., it was not observed a decrease of membrane conductance. Furthermore, the net *I*-*V* relationship of the nicotine-induced current had a reversal potential near 0 mV, ranging from -8 to 10 mV (Fig. 6B). To determine whether the response was mediated by nAChRs, 100 μ M mecamylamine was applied to the same astrocyte, and under this condition nicotine elicited no response (Fig. 6C). After washing out the antagonist for 10 min the response partially recovered (Fig. 6D).

4. Discussion

In the present work we described different effects of nicotine on membrane currents in astrocytes from the CA1 area of the newborn rat hippocampus. When the intracellular solution contained K^+ , nicotine generated sustained inward currents, decaying inward currents, outward currents, and biphasic currents. Although, it will be interesting to explore nicotine effects in all these types of responses, this study focused on sustained inward currents, in which nicotine had two opposite effects: an increase of inward current associated with an increase of membrane conductance, and a reduction of outward current associated with a decrease of

980

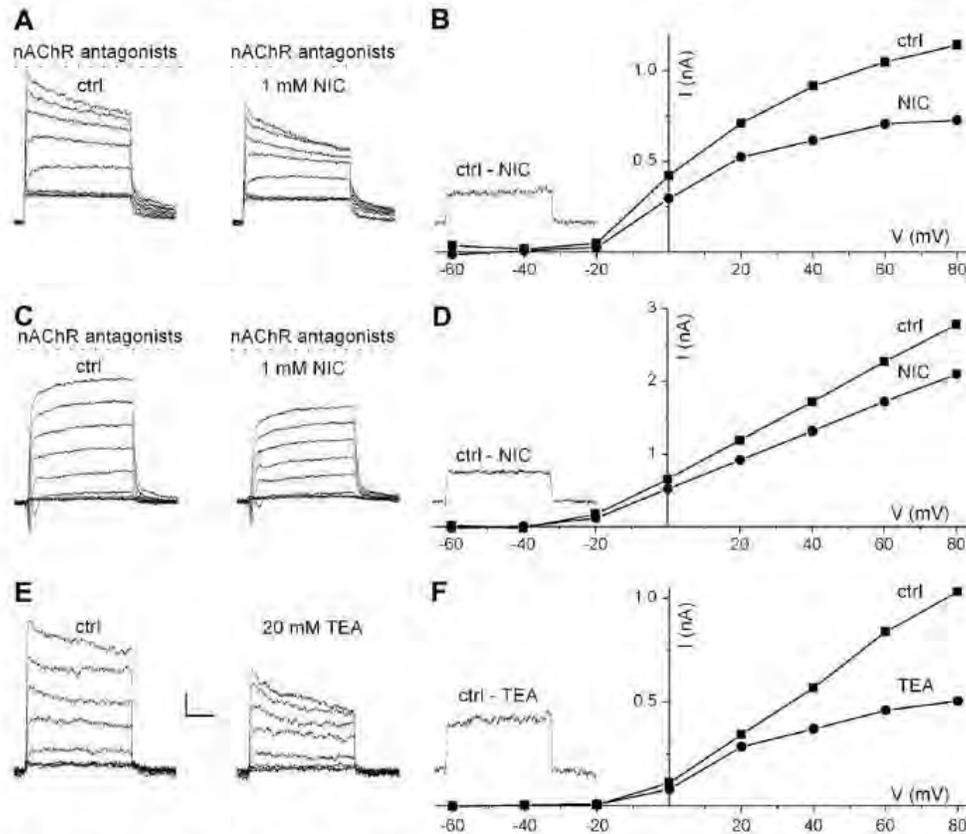
M. Hernández-Morales, J. García-Colunga / *Neuropharmacology* 56 (2009) 975–983

Fig. 4. Inhibition of K⁺ currents by nicotine in hippocampal astrocytes. (A, C) Ion currents activated by voltage pulses (see text) in the control solution (left) and during nicotine application (right), both in the continuous presence of the cocktail of nAChR antagonists (dotted line). (B, D) *I*-*V* relationships [from (A) and (C)] were measured at the end of voltage pulses, in the control solution (squares) and with nicotine (circles). Insets: nicotine-sensitive currents, obtained at 80 mV by subtracting the current during nicotine application from that in the control solution (ctrl - NIC). (E) Ion currents [obtained as in (A) and (C)] in the control solution and during tetraethylammonium (TEA) application. (F) *I*-*V* relationships [from (E)] in the control solution (squares) and with TEA (circles). Inset: TEA-sensitive current at 80 mV (ctrl - TEA). The horizontal bar corresponds to 50 ms for all records, 0.3 nA (A; B, inset), 0.5 nA (C; D, inset), and 0.2 nA (E; F, inset).

membrane conductance. These two effects of nicotine were due to activation of nAChRs and inhibition of a non-decaying K⁺ current, respectively.

In a different set of experiments, in which the intracellular solution contained Cs⁺ in order to block the K⁺ current, nicotine induced responses mediated by nAChRs in 36% of astrocytes. This percent of responding CA1 hippocampal astrocytes is within the range (17.7–71.6%) for the percent of astrocytes from the same region detected with an antibody against the $\alpha 4$ nAChR subunit among different mouse strains (Gahring et al., 2004a,b).

The inward and outward currents induced by nicotine in hippocampal astrocytes correspond to a depolarization and a hyperpolarization, respectively. The most typical response to nicotine is a depolarization of the cell through activation of nAChRs (Arneric et al., 2007; Dani and Bertrand, 2007; Douglas et al., 1967). However, some studies report a membrane hyperpolarization induced by nAChR agonists (Sorenson and Gallagher, 1996; Wong and Gallagher, 1989).

The different nicotine-induced responses observed in this study might be explained by different subpopulations of CA1 hippocampal astrocytes that may express different nAChR subunits, as has been found in some astrocytes from this region that express $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, and $\beta 4$ (Gahring et al., 2004a,b; Graham et al., 2003). It is known that different subunit composition of nAChRs confers their

particular biophysical and pharmacological properties (Dani and Bertrand, 2007; Gotti et al., 2006).

Outward and biphasic currents generated by nicotine are not common effects (see Fig. 1E). However, some studies report a membrane hyperpolarization induced by nAChR agonists, as in rat dorsolateral septal nucleus neurons (Sorenson and Gallagher, 1996; Wong and Gallagher, 1989). Furthermore, in rat diaphragm muscle cells, activation of nAChRs modulates the Na⁺, K⁺-ATPase, leading to membrane hyperpolarization that is blocked by nAChR antagonists (Krivoi et al., 2006). The activation of nAChRs by acetylcholine generated membrane depolarization followed by hyperpolarization in outer hair cells, and the hyperpolarization was produced by activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels (Housley and Ashmore, 1991; Kong et al., 2006).

To date there are no studies concerning the effects of nicotine on ion currents in astrocytes. Here, we found that in all astrocytes examined in the presence of the nAChR antagonists (mecamylamine, methyllycaconitine plus dihydro- β -erythroidine), nicotine inhibited a non-decaying K⁺ current, indicating that this effect was not mediated by activation of nAChRs. Thus, the most likely possibility is that nicotine interacts directly with K⁺ channels in astrocytes from the CA1 area of the rat hippocampus.

Unlike the findings in the present study, it has been reported that effects of nicotine on K⁺ currents may be exerted through

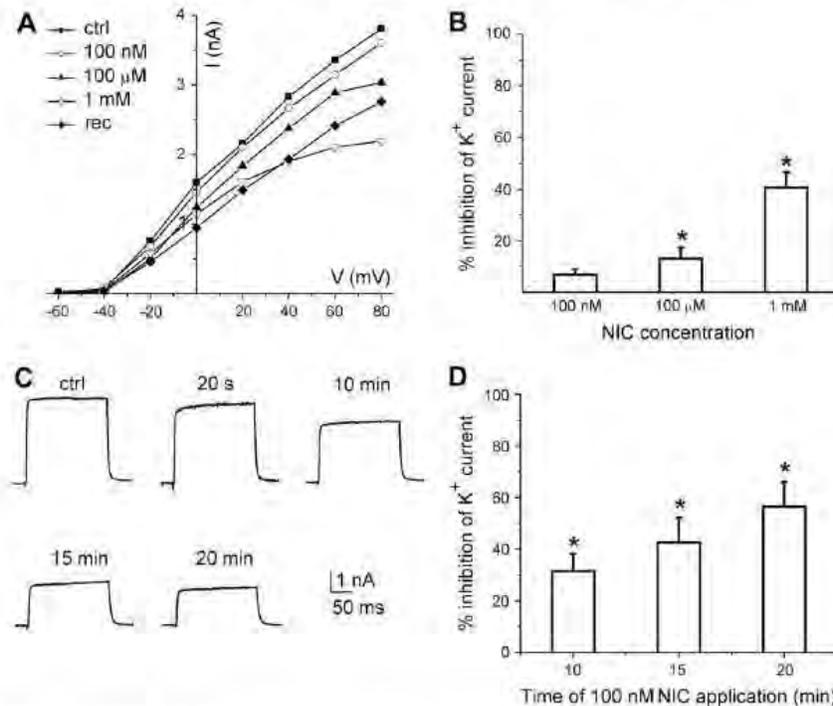


Fig. 5. Inhibition of K^+ currents by low concentrations of nicotine. (A) Samples of I - V relationships recorded from one astrocyte. The magnitude of current was measured at the end of the voltage pulses, in the absence (filled squares) and in the presence of 100 nM (open circles), 100 μ M (filled triangles), 1 mM (open diamonds) nicotine, and after 10 min of washout nicotine (rec; filled diamonds). (B) The height of the columns is the percent of inhibition of the K^+ current by nicotine ($*P < 0.05$; $n = 4-23$). (C) Ion currents activated by a voltage pulse at 80 mV, recorded from one astrocyte, in the control solution, and in the presence of 100 nM nicotine, after the times indicated above the traces. (D) The percent of inhibition of the K^+ current by different times of 100 nM nicotine exposure ($*P < 0.05$; $n = 4-6$).

activation of nAChRs, as in rat striatal neurons, in which dihydro- β -erythroidine ($\alpha 4\beta 2$ nAChR antagonist) reverted, and nAChR agonists reproduced the inhibition of K^+ currents, respectively (Hamon et al., 1997).

On the other hand, nicotine causes a dual effect in vascular smooth muscle cells, where it increases or decreases the tetraethylammonium-sensitive K^+ current, with 1–100 μ M or 0.3–3 mM nicotine, respectively (Tang et al., 1999). In the former case, the effect of nicotine is mediated by a nAChR-dependent mechanism. In the latter case, nicotine interacts directly with K^+ channels, as seems to occur in CA1 hippocampal astrocytes.

In other cases, nicotine exclusively inhibits inward rectifier K^+ channels (Kir2.1 and Kir2.2) and transient outward K^+ channels (Kv4.2 and Kv4.3) expressed in *Xenopus* oocytes, because antagonists of nAChRs did not revert the depressed currents (Wang et al., 1999a,b, 2000a,b).

Although, the roles of the K_{DR} current in glial cells are little known, in the CA1 area of the rat hippocampus around 88% of astrocytes exhibit K_{DR} currents (Sontheimer and Waxman, 1993). For instance, in microglial cells activated by lipopolysaccharide, the K_{DR} current might be participated in set the resting membrane potential (Chung et al., 1998). Furthermore, the down regulation of Kv1.5 protein, that mediates the predominant component of the K_{DR} current in spinal cord and cortical astrocytes, inhibits their proliferation (MacFarlane and Sontheimer, 2000). In the present work, nicotine seems to inhibit mainly the K_{DR} current, between –20 and 80 mV and therefore nicotine might regulate the above astrocytic events.

Additionally, it is known that astrocytes from the CA1 area of the hippocampus express nAChR subunits (Gahring et al., 2004a,b). Although there are a few studies dealing with nicotine effects on astrocytes (Höslí et al., 1988; Oikawa et al., 2005), nicotine acts as an agonist for nAChRs in a fraction of hippocampal astrocytes with properties similar to those of nAChRs in neurons, astrocytes, and heterologous expression systems (Alkondon and Albuquerque, 1993; Chávez-Noriega et al., 1997; Sharma and Vijayaraghavan, 2001).

The inhibition of K^+ channels by nicotine could alter K^+ homeostasis, which is crucial for brain functions in which astrocytes participate in K^+ reuptake after neuronal activity (Butt and Kalsi, 2006; Kofuji and Newman, 2004). The blockage of these channels produces K^+ accumulation in the extracellular space that could elicit an epileptiform activity (D'Ambrosio et al., 1998; Janigro et al., 1997). Additionally, nicotine activates nAChRs in cortical astrocytes, increasing the intracellular Ca^{2+} concentration (Oikawa et al., 2005). Furthermore, astrocytic intracellular Ca^{2+} increases (triggered by mechanical, electrical, and/or chemical stimuli) release glutamate, which affects the activity of adjacent neurons (Jourdain et al., 2007; Perea and Araque, 2007).

Interestingly, here we found that long exposure (20 min) of 100 nM nicotine inhibited more potently astrocyte K^+ currents (~56%) than acute 1 mM nicotine (a concentration that is unlikely to be reached in smokers), which inhibited astrocyte K^+ currents by ~43%. These results might be relevant considering that in regular cigarette smokers, nicotine concentration in the venous blood is 60–300 nM; whereas in the arterial blood, which better represents

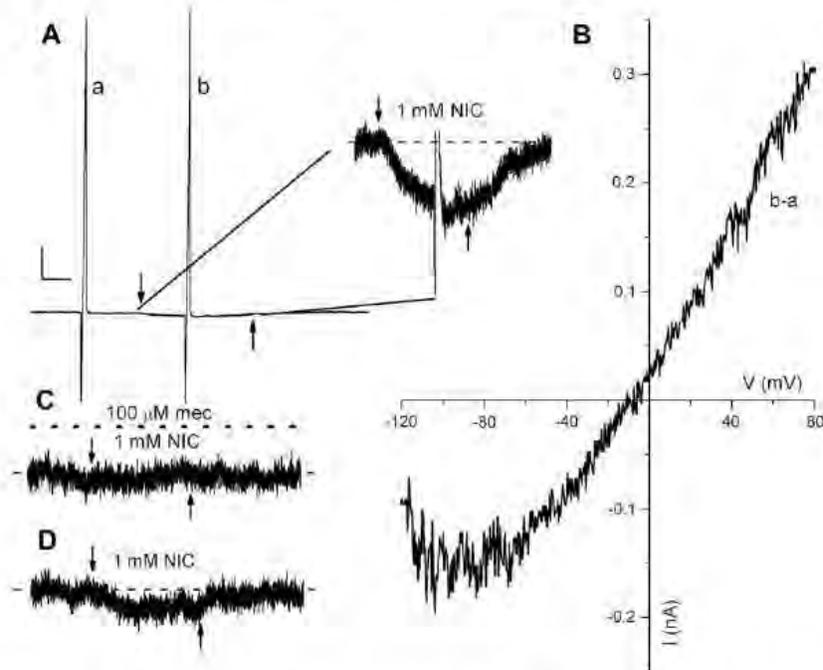


Fig. 6. Activation of nAChRs by nicotine in hippocampal astrocytes. (A) Inward current induced by nicotine and the responses to voltage ramps in the control solution (a) and during nicotine application (b). Inset: same response at higher resolution. (B) The net $I-V$ relationship of the nicotine-induced current obtained from (A). (C) Mecamylamine (mec) was applied onto the astrocyte 1 min before and during the application of nicotine (dotted line). (D) Partial recovery of the nicotine response after a 10-min wash to remove mecamylamine. Vertical bar corresponds to 1 nA (A) and 50 pA (inset, C, D), and the horizontal bar to 5 s for all records.

the nicotine level in the brain, is 600 nM, and its half-life is close to 2 h (Le Houezec, 2003; Benowitz, 2008).

In conclusion, the present study shows different effects of nicotine on cultured astrocytes from the CA1 region of the rat hippocampus: (1) activation of nAChRs, (2) inhibition of K^+ currents, or (3) the combination of both effects in the same cell. Interestingly, these effects of nicotine would result in astrocyte depolarization, which might trigger important cellular events such as the intracellular Ca^{2+} increase, Ca^{2+} waves that propagate to neighboring astrocytes, transmitter release, and modulation of synaptic transmission (Araque et al., 2002; Halassa et al., 2007; Jourdain et al., 2007; Perea and Araque, 2007). In this sense, it is important to take into consideration the complexity of nicotine effects on functions and malfunctions in the brain (Gotti et al., 2006; Levín et al., 2006).

Although further physiological and pharmacological studies are required to understand the roles of nicotine and the presence of different nAChR subtypes on glial cells, the present results may contribute to the better understanding of the functions of astrocytes, the participation of nAChRs, as well as the effects of nicotine in the hippocampus and in the brain in general.

Acknowledgments

We are grateful to Martín García Servín for help in caring the rats and to Leonor Casanova Rico for administrative assistance. This work was supported by Grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México 44015Q, 81911 and by a Grant from Dirección General de Asuntos del Personal Académico IN 212906-3 to J.G.C.; M.H.M. was supported by CONACyT and DGEP-UNAM

fellowships while conducting Ph.D. studies in PDCB-UNAM. We express our gratitude to Dr. Dorothy Pless for critically reviewing the manuscript.

References

- Alkondon, M., Albuquerque, E.X., 1993. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 1455–1473.
- Araque, A., Martin, E.D., Perea, G., Arellano, J.L., Buño, W., 2002. Synaptically released acetylcholine evokes Ca^{2+} elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 22, 2443–2450.
- Americ, S.P., Holladay, M., Williams, M., 2007. Neuronal nicotinic receptors: a perspective on two decades of drug discovery research. *Biochem. Pharmacol.* 74, 1092–1101.
- Bekar, L.K., Loewen, M.E., Cao, K., Sun, X., Leis, J., Wang, R., Forsyth, G.W., Walt, W., 2005. Complex expression and localization of inactivating Kv channels in cultured hippocampal astrocytes. *J. Neurophysiol.* 93, 1699–1709.
- Benowitz, N.L., 2008. Neurobiology of nicotine addiction: implications for smoking cessation treatment. *Am. J. Med.* 121, S3–S10.
- Bordey, A., Sontheimer, H., 1997. Postnatal development of ionic currents in rat hippocampal astrocytes in situ. *J. Neurophysiol.* 78, 461–477.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., Ellisman, M.H., 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 22, 183–192.
- Butt, A.M., Kalsi, A., 2006. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J. Cell Mol. Med.* 10, 33–44.
- Chung, S., Joe, E., Soh, H., Lee, M.Y., Bang, H.W., 1998. Delayed rectifier potassium currents induced in activated rat microglia set the resting membrane potential. *Neurosci. Lett.* 242, 73–76.
- Chávez-Noriega, L.E., Crona, J.H., Washburn, M.S., Urrutia, A., Elliott, K.J., Johnson, E.C., 1997. Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$ and $\alpha 7$ expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 346–356.
- Connor, J.A., Stevens, C.F., 1971. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol.* 213, 21–30.

- D'Ambrosio, R., Wenzel, J., Schwartzkroin, P.A., Mckhann 2nd, G.M., Janigro, D., 1998. Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J. Neurosci.* 18, 4425–4438.
- Dani, J.A., Bertrand, D., 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 699–729.
- Douglas, W.W., Kanno, T., Sampson, S.R., 1967. Effects of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture. *J. Physiol.* 188, 107–120.
- Dwoskin, L.P., Crooks, P.A., 2001. Competitive neuronal nicotinic receptor antagonists: a new direction for drug discovery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 395–402.
- Gahring, L.C., Persiyanov, K., Dunn, D., Weiss, R., Meyer, E.L., Rogers, S.W., 2004a. Mouse strain-specific nicotinic acetylcholine receptor expression by inhibitory interneurons and astrocytes in the dorsal hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 468, 334–346.
- Gahring, L.C., Persiyanov, K., Rogers, S.W., 2004b. Neuronal and astrocyte expression of nicotinic receptor subunit beta4 in the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 468, 322–333.
- Gotti, C., Zoli, M., Clementi, F., 2006. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 482–491.
- Graham, A.J., Ray, M.A., Perry, E.K., Jaros, E., Perry, R.H., Volsen, S.G., Bose, S., Evans, N., Lindstrom, J., Court, J.A., 2003. Differential nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in the human hippocampus. *J. Chem. Neuroanat.* 25, 97–113.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Haydon, P.G., 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol. Med.* 13, 54–63.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85–100.
- Hamon, B., Glowinski, J., Giaume, C., 1997. Nicotine inhibits slowly inactivating K⁺ currents in rat cultured striatal neurons. *Pflügers Arch.* 434, 642–645.
- Hernández-Morales, M., García-Colunga, J., 2007. Responses elicited by nicotine in CA1 hippocampal astrocytes. *Neuron Glia Biol.* 3, 5170.
- Hille, B., 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc, U.S.A., p. 157.
- Housley, G.D., Ashmore, J.F., 1991. Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Proc. Biol. Sci.* 244, 161–167.
- Höslí, L., Höslí, E., Della Briotta, G., Quadri, L., Heuss, L., 1988. Action of acetylcholine, muscarine, nicotine and antagonists on the membrane potential of astrocytes in cultured rat brainstem and spinal cord. *Neurosci. Lett.* 92, 165–170.
- Janigro, D., Gasparini, S., D'Ambrosio, R., Mckhann 2nd, G.M., DiFrancesco, D., 1997. Reduction of K⁺ uptake in glia prevents long-term depression maintenance and causes epileptiform activity. *J. Neurosci.* 17, 2813–2824.
- Jensen, A.A., Frølund, B., Liljefors, T., Krosgaard-Larsen, P., 2005. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J. Med. Chem.* 48, 4705–4745.
- Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V., Volterra, A., 2007. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat. Neurosci.* 10, 331–339.
- Kofuji, P., Newman, E.A., 2004. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129, 1045–1056.
- Kong, W.J., Guo, C.K., Zhang, S., Zhang, X.W., Wang, Y.J., Li, Z.W., 2006. Fast cholinergic efferent inhibition in guinea pig outer hair cells. *Brain Res.* 1102, 103–108.
- Krivoi, I.L., Drabkina, T.M., Kravtsova, V.V., Vasiliev, A.N., Eaton, M.J., Skatchkov, S.N., Mandel, F., 2006. On the functional interaction between nicotinic acetylcholine receptor and Na⁺, K⁺-ATPase. *Pflügers Arch.* 452, 756–765.
- Le Houezec, J., 2003. Role of nicotine pharmacokinetics in nicotine addiction and nicotine replacement therapy: a review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 7, 811–819.
- Levin, E.D., McClemon, F.J., Rezvani, A.H., 2006. Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology (Berl.)* 184, 523–539.
- Liu, L., Zhu, W., Zhang, Z.S., Yang, T., Grant, A., Oxford, G., Simon, S.A., 2004. Nicotine inhibits voltage-dependent sodium channels and sensitizes vanilloid receptors. *J. Neurophysiol.* 91, 1482–1491.
- MacFarlane, S.N., Sontheimer, H., 2000. Modulation of Kv1.5 currents by Src tyrosine phosphorylation: potential role in the differentiation of astrocytes. *J. Neurosci.* 20, 5245–5253.
- Mansvelder, H.D., van Aerde, K.I., Couey, J.J., Brussaard, A.B., 2006. Nicotinic modulation of neuronal networks: from receptors to cognition. *Psychopharmacology (Berl.)* 184, 292–305.
- Montiel-Herrera, M., Milei, R., García-Colunga, J., 2006. Membrane currents elicited by angiotensin II in astrocytes from the rat corpus callosum. *Glia* 53, 366–371.
- Oikawa, H., Nakamichi, N., Kambe, Y., Ogura, M., Yoneda, Y., 2005. An increase in intracellular free calcium ions by nicotinic acetylcholine receptors in a single cultured rat cortical astrocyte. *J. Neurosci. Res.* 79, 535–544.
- Papke, R.L., Sanberg, P.R., Shytle, R.D., 2001. Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 646–656.
- Papura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jęftinija, K., Jęftinija, S., Haydon, P.G., 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369, 744–747.
- Perea, G., Araque, A., 2007. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317, 1083–1086.
- Ransom, C.B., Sontheimer, H., 1995. Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K⁺ currents in rat spinal cord astrocytes. *J. Neurophysiol.* 73, 333–346.
- Reyes-Haro, D., Milei, R., García-Colunga, J., 2005. Potassium currents in primary cultured astrocytes from the rat corpus callosum. *J. Neurocytol.* 34, 411–420.
- Satoh, H., 2002. Modulation by nicotine of the ionic currents in guinea pig ventricular cardiomyocytes. Relatively higher sensitivity to I_{K1} and I_{Kr}. *Vascul. Pharmacol.* 39, 55–61.
- Sharma, G., Vijayaraghavan, S., 2001. Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 4148–4153.
- Sontheimer, H., Waxman, S.G., 1993. Expression of voltage-activated ion channels by astrocytes and oligodendrocytes in the hippocampal slice. *J. Neurophysiol.* 70, 1863–1873.
- Sorenson, E.M., Gallagher, J.P., 1996. The membrane hyperpolarization of rat dorsolateral septal nucleus neurons is mediated by a novel nicotinic receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277, 1733–1743.
- Tang, G., Hanna, S.T., Wang, R., 1999. Effects of nicotine on K⁺ channel currents in vascular smooth muscle cells from rat tail arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 364, 247–254.
- Wang, H., Shi, H., Liao, S., Wang, Z., 1999a. Inactivation gating determines nicotine blockade of human HERG channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 277, 1081–1088.
- Wang, H., Shi, H., Wang, Z., 1999b. Nicotine depresses the functions of multiple cardiac potassium channels. *Life Sci.* 65, 143–149.
- Wang, H., Shi, H., Zhang, L., Pourrier, M., Yang, B., Nattel, S., Wang, Z., 2000a. Nicotine is a potent blocker of the cardiac A-type K⁺ channels: effects on cloned Kv4.3 channels and native transient outward current. *Circulation* 102, 1165–1171.
- Wang, H., Yang, B., Zhang, L., Xu, D., Wang, Z., 2000b. Direct block of inward rectifier potassium channels by nicotine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 97–101.
- Wong, L.A., Gallagher, J.P., 1989. A direct nicotinic receptor-mediated inhibition recorded intracellularly in vitro. *Nature* 341, 439–442.

CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA

Adrian CL, Olin HB, Dalhoff K, Jacobsen J. 2006. In vivo human buccal permeability of nicotine. *Int J Pharm.* 311:196-202.

Afar R, Trifaró JM, Quik M. 1994. Nicotine-induced intracellular calcium changes are not antagonized by α -bungarotoxin in adrenal medullary cells. *Brain Res.* 641:127-131.

Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Soriano E. 2002. Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J Neurosci.* 22:9430-9444.

Ahern CA, Kobertz WR. 2009. Chemical tools for K⁺ channel biology. *Biochemistry* 48:517-526.

Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 89:73-120.

Alkondon M, Albuquerque EX. 1993. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 265:1455-1473.

Alkondon M, Pereira EF, Albuquerque EX. 1998. α -bungarotoxin and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices. *Brain Res.* 810:257-263.

Alkondon M, Pereira EF, Almeida LE, Randall WR, Albuquerque EX. 2000. Nicotine at concentrations found in cigarette smokers activates and desensitizes nicotinic acetylcholine receptors in CA1 interneurons of rat hippocampus. *Neuropharmacology* 39:2726-2739.

Amaral DG, Witter MP. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.

Araque A. 2008. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol.* 4:3-10.

Arneric SP, Holladay M, Williams M. 2007. Neuronal nicotinic receptors: a perspective on two decades of drug discovery research. *Biochem. Pharmacol.* 74:1092-1101.

Barrantes GE, Murphy CT, Westwick J, Wonnacott S. 1995. Nicotine increases intracellular calcium in rat hippocampal neurons via voltage-gated calcium channels. *Neurosci Lett.* 196:101-104.

Bekar LK, Loewen ME, Cao K, Sun X, Leis J, Wang R, Forsyth GW, Walz W. 2005. Complex expression and localization of inactivating Kv channels in cultured hippocampal astrocytes. *J Neurophysiol.* 93, 1699-1709.

Benes FM, Berretta S. 2001. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 25:1-27.

Benowitz NL. 2008. Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 83:531-541.

Berger T, Frotscher M. 1994. Distribution and morphological characteristics of oligodendrocytes in the rat hippocampus in situ and in vitro: an immunocytochemical study with the monoclonal Rip antibody. *J Neurocytol.* 23:61-74.

Bisset D, Chung SH. 2008. Efficacy of external tetraethylammonium block of the KcsA potassium channel: molecular and Brownian dynamics studies. *Biochim Biophys Acta* 1778:2273-2282.

Bordey A, Sontheimer H. 1997. Postnatal development of ionic currents in rat hippocampal astrocytes in situ. *J Neurophysiol.* 78:461-477.

Bottenstein JE. 1988. Advances in vertebrate cell culture methods. *Science* 239:G42-G48.

Brzyska M, Michalski A, Elbaum D. 2002. Tetraethylammonium-induced changes in intracellular calcium in Alzheimer donor fibroblasts. *Neuroscience research communications* 30:51-61.

Burgos M, Pastor MD, González JC, Martínez-Galan JR, Vaquero CF, Fradejas N, Benavides A, Hernández-Guijo JM, Tranque P, Calvo S. 2007. PKCepsilon upregulates voltage-dependent calcium channels in cultured astrocytes. *Glia* 55:1437-1448.

Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci.* 22:183-192.

Butt AM, Kalsi A. 2006. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med.* 10:33-44.

Cai SQ, Li W, Sesti F. 2007. Multiple modes of A-type potassium current regulation. *Curr Pharm Des.* 13:3178-3184.

Catalani A, Sabbatini M, Consoli C, Cinque C, Tomassoni D, Azmitia E, Angelucci L, Amenta F. 2002. Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus. *Mech Ageing Dev.* 123:481-490.

Chávez-Noriega LE, Gillespie A, Stauderman KA, Crona JH, Claeps BO, Elliott KJ, Reid RT, Rao TS, Velicelebi G, Harpold MM, Johnson EC, Corey-Naeve J. 2000. Characterization of the recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 4\beta 2$ stably expressed in HEK293 cells. *Neuropharmacology* 39:2543-2560.

Chen PH, Cai WQ, Wang LY, Deng QY. 2008. A morphological and electrophysiological study on the postnatal development of oligodendrocyte precursor cells in the rat brain. *Brain Res.* 1243:27-37.

Chu ZG, Zhou FM, Hablitz JJ. 2000. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated synaptic potentials in rat neocortex. *Brain Res.* 887:399-405.

Chung S, Joe E, Soh H, Lee MY, Bang HW. 1998. Delayed rectifier potassium currents induced in activated rat microglia set the resting membrane potential. *Neurosci Lett.* 242:73-76.

Conejo NM, González-Pardo H, Pedraza C, Navarro FF, Vallejo G, Arias JL. 2003. Evidence for sexual difference in astrocytes of adult rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 339:119-122.

Connor JA, Stevens CF. 1971. Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J Physiol.* 213:21-30.

Dajas-Bailador F, Wonnacott S. 2004. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 25:317-324.

Dajas-Bailador FA, Mogg AJ, Wonnacott S. 2002. Intracellular Ca^{2+} signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca^{2+} channels and Ca^{2+} stores. *J Neurochem.* 81:606-614.

Dani JA, Bertrand D. 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47:699-729.

Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ. 1992. Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8:429-440.

D'Ascenzo M, Vairano M, Andreassi C, Navarra P, Azzena GB, Grassi C. 2004. Electrophysiological and molecular evidence of L-(Cav1), N-(Cav2.2), and R-(Cav2.3) type Ca²⁺ channels in rat cortical astrocytes. *Glia* 45:354-363.

Delbro D, Westerlund A, Björklund U, Hansson E. 2009. In inflammatory reactive astrocytes co-cultured with brain endothelial cells nicotine-evoked Ca²⁺ transients are attenuated due to interleukin-1beta release and rearrangement of actin filaments. *Neuroscience* 159:770-779.

Di Matteo V, Pierucci M, Di Giovanni G, Benigno A, Esposito E. 2007. The neurobiological bases for the pharmacotherapy of nicotine addiction. *Curr Pharm Des.* 13:1269-1284.

Dorostkar MM, Boehm S. 2008. Presynaptic ionotropic receptors. *Handb Exp Pharmacol.* 184:479-527.

Douglas WW, Kanno T, Sampson SR. 1967. Effects of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture. *J Physiol.* 188:107-120.

Dwoskin LP, Crooks PA. 2001. Competitive neuronal nicotinic receptor antagonists: a new direction for drug discovery. *J Pharmacol Exp Ther.* 298:395-402.

Eng LF. 1985. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol.* 8:203-214.

Eyüpoglu IY, Bechmann I, Nitsch R. 2003. Modification of microglia function protects from lesion-induced neuronal alterations and promotes sprouting in the hippocampus. *FASEB J.* 17:1110-1111.

Fabian-Fine R, Skehel P, Errington ML, Davies HA, Sher E, Stewart MG, Fine A. 2001. Ultrastructural distribution of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *J Neurosci.* 21:7993-8003.

Failli P, Tesco G, Ruocco C, Ginestroni A, Amaducci L, Giotti A, Sorbi S. 1996. The effect of tetraethylammonium on intracellular calcium concentration in Alzheimer's

disease fibroblasts with APP, S182 and E5-1 missense mutations. *Neurosci Lett.* 208:216-218.

Fejér-Kossey O. 1967. The separation of ten tobacco alkaloids by thin-layer chromatography. *J Chromatogr.* 31:592-593.

Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G. 2006a. Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J Biol Chem.* 281:4274-4284.

Fellin T, Sul JY, D'Ascenzo M, Takano H, Pascual O, Haydon PG. 2006b. Bidirectional astrocyte-neuron communication: the many roles of glutamate and ATP. *Novartis Found Symp.* 276:208-217.

Fiacco TA, McCarthy KD. 2006. Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. *Glia* 54:676-690.

French RJ, Zamponi GW. 2005. Voltage-gated sodium and calcium channels in nerve, muscle, and heart. *IEEE Trans Nanobioscience.* 4:58-69.

Fucile S. 2004. Ca^{2+} permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium.* 35:1-8.

Gahring LC, Persiyarov K, Dunn D, Weiss R, Meyer EL, Rogers SW. 2004a. Mouse strain-specific nicotinic acetylcholine receptor expression by inhibitory interneurons and astrocytes in the dorsal hippocampus. *J Comp Neurol.* 468:334-346.

Gahring LC, Persiyarov K, Rogers SW. 2004b. Neuronal and astrocyte expression of nicotinic receptor subunit $\beta 4$ in the adult mouse brain. *J Comp Neurol.* 468:322-333.

Glennon RA, Dukat M. 2000. Central nicotinic receptor ligands and pharmacophores. *Pharm Acta Helv.* 74:103-114.

Gotti C, Zoli M, Clementi F. 2006. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci.* 27:482-491.

Graham AJ, Ray MA, Perry EK, Jaros E, Perry RH, Volsen SG, Bose S, Evans N, Lindstrom J, Court JA. 2003. Differential nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in the human hippocampus. *J Chem Neuroanat.* 25:97-113.

Grosche J, Matyash V, Möller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H. 1999. Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci.* 2:139-143.

Haeusler G, Thorens S. 1980. Effects of tetraethylammonium chloride on contractile, membrane and cable properties of rabbit artery muscle. *J Physiol.* 303:203-224.

Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med.* 13:54-63.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391:85-100.

Hamon B, Glowinski J, Giaume C. 1997. Nicotine inhibits slowly inactivating K^+ currents in rat cultured striatal neurons. *Pflugers Arch.* 434:642-645.

Henderson Z, Boros A, Janzso G, Westwood AJ, Monyer H, Halasy K. 2005. Somato-dendritic nicotinic receptor responses recorded in vitro from the medial septal diagonal band complex of the rodent. *J Physiol.* 562:165-182.

Hernández-Morales M, García-Colunga J. 2009. Effects of nicotine on K^+ currents and nicotinic receptors in astrocytes of the hippocampal CA1 region. *Neuropharmacology* 56:975-983.

Hille B. 2001. Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates, Inc, U.S.A.

Hösli E, Hösli L. 1988. Autoradiographic localization of binding sites for muscarinic and nicotinic agonists and antagonists on cultured astrocytes. *Exp Brain Res.* 71:450-454.

Hösli E, Hösli L. 2000. Colocalization of neurotransmitter receptors on astrocytes in explant cultures of rat CNS. *Neurochem Int.* 36:301-311.

Hösli L, Hösli E, Della Briotta G, Quadri L, Heuss L. 1988. Action of acetylcholine, muscarine, nicotine and antagonists on the membrane potential of astrocytes in cultured rat brainstem and spinal cord. *Neurosci Lett.* 92:165-170.

Housley GD, Ashmore JF. 1991. Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Proc. Biol. Sci.* 244:161-167.

Ishizuka N, Cowan WM, Amaral DG. 1995. A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J Comp Neurol.* 362:17-45.

Jensen ML, Schousboe A, Ahring PK. 2005. Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *J Neurochem.* 92:217-225.

Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A. 2007. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci.* 10:331-339.

Kong WJ, Guo CK, Zhang S, Zhang XW, Wang YJ, Li ZW. 2006. Fast cholinergic efferent inhibition in guinea pig outer hair cells. *Brain Res.* 1102:103-108.

Krivoi II, Drabkina TM, Kravtsova VV, Vasiliev AN, Eaton MJ, Skatchkov SN, Mandel F. 2006. On the functional interaction between nicotinic acetylcholine receptor and Na⁺,K⁺-ATPase. *Pflugers Arch.* 452:756-765.

Kulik A, Haentzsch A, Lückermann M, Reichelt W, Ballanyi K. 1999. Neuron-glia signaling via $\alpha 1$ adrenoceptor-mediated Ca²⁺ release in Bergmann glial cells in situ. *Neurosci.* 19:8401-8408.

Kullmann DM, Lamsa KP. 2007. Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat Rev Neurosci.* 8:687-699.

Kumari V, Gray JA, Ffytche DH, Mitterschiffthaler MT, Das M, Zachariah E, Vythelingum GN, Williams SC, Simmons A, Sharma T. 2003. Cognitive effects of nicotine in humans: an fMRI study. *Neuroimage* 19:1002-1013.

Laming PR, Kimelberg H, Robinson S, Salm A, Hawrylak N, Müller C, Roots B, Ng K. 2000. Neuronal-glia interactions and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev.* 24:295-340.

Langley JN. 1905. On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curare. *J Physiol.* 33:374-413.

Latour I, Hamid J, Beedle AM, Zamponi GW, Macvicar BA. 2003. Expression of voltage-gated Ca²⁺ channel subtypes in cultured astrocytes. *Glia* 41:347-353.

Le Houezec J. 2003. Role of nicotine pharmacokinetics in nicotine addiction and nicotine replacement therapy: a review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 7:811-819.

Le Novère N, Corringer PJ, Changeux JP. 2002. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol.* 53:447-456.

Lendvai B, Vizi ES. 2008. Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors. *Physiol Rev.* 88:333-349.

Levin ED, Conners CK, Silva D, Canu W, March J. 2001. Effects of chronic nicotine and methylphenidate in adults with attention deficit/hyperactivity disorder. *Exp Clin Psychopharmacol.* 9:83-90.

Levin ED, Limpuangthip J, Rachakonda T, Peterson M. 2006. Timing of nicotine effects on learning in zebrafish. *Psychopharmacology (Berl)* 184:547-552.

Liu L, Zhu W, Zhang ZS, Yang T, Grant A, Oxford G, Simon SA. 2004. Nicotine inhibits voltage-dependent sodium channels and sensitizes vanilloid receptors. *J Neurophysiol.* 91:1482-1491.

López-Hernández GY, Biaggi-Labiosa NM, Torres-Cintrón A, Ortiz-Acevedo A, Lasalde-Dominicci JA. 2009. Contribution of position alpha4S336 on functional expression and up-regulation of $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptors. *Cell Mol Neurobiol.* 29:41-53.

Luetje CW, Patrick J. 1991. Both α - and β -subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci.* 11:837-845.

Maccaferri G, Lacaille JC. 2003. Interneuron diversity series: hippocampal interneuron classifications-making things as simple as possible, not simpler. *Trends Neurosci.* 26:564-571.

MacFarlane SN, Sontheimer H. 2000. Modulation of Kv1.5 currents by Src tyrosine phosphorylation: potential role in the differentiation of astrocytes. *J Neurosci.* 20:5245-5253.

Marcaggi P, Attwell D. 2004. Role of glial amino acid transporters in synaptic transmission and brain energetics. *Glia* 47:217-225.

Mathie A, Colquhoun D, Cull-Candy SG. 1990. Rectification of currents activated by nicotinic acetylcholine receptors in rat sympathetic ganglion neurones. *J Physiol.* 427:625-655.

Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, Hüttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhäuser C. 2003. Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci.* 23:1750-1758.

McClernon FJ, Gilbert DG, Radtke R. 2003. Effects of transdermal nicotine on lateralized identification and memory interference. *Hum Psychopharmacol.* 18:339-343.

McKay BE, Placzek AN, Dani JA. 2007. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol.* 74:1120-1133.

Meier SD, Kafitz KW, Rose CR. 2008. Developmental profile and mechanisms of GABA-induced calcium signaling in hippocampal astrocytes. *Glia* 56:1127-1137.

Miller RF. 2004. D-Serine as a glial modulator of nerve cells. *Glia* 47:275-283.

Naber PA, Witter MP, Lopes Silva FH. 2000. Networks of the hippocampal memory system of the rat. The pivotal role of the subiculum. *Ann N Y Acad Sci.* 911:392-403.

Nakauchi S, Brennan RJ, Boulter J, Sumikawa K. 2007. Nicotine gates long-term potentiation in the hippocampal CA1 region via the activation of $\alpha 2^*$ nicotinic ACh receptors. *Eur J Neurosci.* 25:2666-2681.

Naus CC, Bechberger JF, Zhang Y, Venance L, Yamasaki H, Juneja SC, Kidder GM, Giaume C. 1997. Altered gap junctional communication, intercellular signaling, and growth in cultured astrocytes deficient in connexin43. *J Neurosci Res.* 49:528-540.

Neher E. 1995. The use of fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes. *Neuropharmacology* 34:1423-1442.

Newman EA. 2004. Glial modulation of synaptic transmission in the retina. *Glia* 47:268-274.

Oikawa H, Nakamichi N, Kambe Y, Ogura M, Yoneda Y. 2005. An increase in intracellular free calcium ions by nicotinic acetylcholine receptors in a single cultured rat cortical astrocyte. *J Neurosci Res.* 79:535-544.

Olsen ML, Sontheimer H. 2008. Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K⁺ buffering to cell differentiation. *J Neurochem.* 107:589-601.

Ono K, Toyono T, Inenaga K. 2008. Nicotinic receptor subtypes in rat subfornical organ neurons and glial cells. *Neuroscience* 154:994-1001.

Papke RL, Sanberg PR, Shytle RD. 2001. Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 297:646-656.

Parpura V, Haydon PG. 2000. Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8629-8634.

Patti L, Raiteri L, Grilli M, Zappettini S, Bonanno G, Marchi M. 2007. Evidence that $\alpha 7$ nicotinic receptor modulates glutamate release from mouse neocortical gliosomes. *Neurochem Int.* 51:1-7.

Paxinos G, Watson C. 2005. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Edición 5. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

Perea G, Araque A. 2005. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci.* 25:2192-2203.

Perea G, Araque A. 2007. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083-1086.

Pischalnikova AV, Sokolova OS. 2009. The domain and conformational organization in potassium voltage-gated ion channels. *J Neuroimmune Pharmacol.* 4:71-82.

Quick MW, Lester RA. 2002. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol.* 53:457-478.

Ransom CB, Sontheimer H. 1995. Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K^+ currents in rat spinal cord astrocytes. *J Neurophysiol.* 73:333-346.

Reyes-Haro D, Miledi R, Garcia-Colunga J. 2005. Potassium currents in primary cultured astrocytes from the rat corpus callosum. *J. Neurocytol.* 34:411-420.

Rogers SW, Gregori NZ, Carlson N, Gahring LC, Noble M. 2001. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression by O2A/oligodendrocyte progenitor cells. *Glia* 33:306-313.

Roy ML, Saal D, Perney T, Sontheimer H, Waxman SG, Kaczmarek LK. 1996. Manipulation of the delayed rectifier Kv1.5 potassium channel in glial cells by antisense oligodeoxynucleotides. *Glia* 18:177-184.

Rubboli F, Court JA, Sala C, Morris C, Chini B, Perry E, Clementi F. 1994. Distribution of nicotinic receptors in the human hippocampus and thalamus. *Eur J Neurosci.* 6:1596-1604.

Satoh H. 2002. Modulation by nicotine of the ionic currents in guinea pig ventricular cardiomyocytes. Relatively higher sensitivity to IKr and IK1. *Vascul. Pharmacol.* 39:55-61.

Schipke CG, Kettenmann H. 2004. Astrocyte responses to neuronal activity. *Glia* 47:226-232.

Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW. 1993. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci.* 13:596-604.

Sharma G, Vijayaraghavan S. 2001. Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4148-4153.

Sharma G, Vijayaraghavan S. 2003. Modulation of presynaptic store calcium induces release of glutamate and postsynaptic firing. *Neuron* 38:929-939.

Sheffield EB, Quick MW, Lester RA. 2000. Nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA expression and channel function in medial habenula neurons. *Neuropharmacology* 39:2591-2603.

Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, Ehrhart J, Silver AA, Sanberg PR, Tan J. 2004. Cholinergic modulation of microglial activation by $\alpha 7$ nicotinic receptors. *J Neurochem.* 89:337-343.

Smart SL, Bosma MM, Tempel BL. 1997. Identification of the delayed rectifier potassium channel, Kv1.6, in cultured astrocytes. *Glia* 20:127-134.

Sontheimer H, Waxman SG. 1993. Expression of voltage-activated ion channels by astrocytes and oligodendrocytes in the hippocampal slice. *J Neurophysiol.* 70:1863-1873.

Sorenson EM, Gallagher JP. 1996. The membrane hyperpolarization of rat dorsolateral septal nucleus neurons is mediated by a novel nicotinic receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 277:1733-1743.

Sudweeks SN, Yakel JL. 2000. Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat CA1 hippocampal neurons. *J Physiol.* 527:515-528.

Swope SL, Moss SJ, Raymond LA, Huganir RL. 1999. Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 33:49-78.

Szabo SI, Zelles T, Lendvai B. 2008a. Intracellular Ca^{2+} dynamics of hippocampal interneurons following nicotinic acetylcholine receptor activation. *Neurochem Int.* 52:135-141.

Szabo SI, Zelles T, Vizi ES, Lendvai B. 2008b. The effect of nicotine on spiking activity and Ca^{2+} dynamics of dendritic spines in rat CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 18:376-385.

Takeuchi N. 1963. Some properties of conductance changes at the end-plate membrane during the action of acetylcholine. *J Physiol.* 167:128-140.

Tang G, Hanna ST, Wang R. 1999. Effects of nicotine on K^+ channel currents in vascular smooth muscle cells from rat tail arteries. *Eur J Pharmacol.* 364:247-254.

Unwin N. 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol.* 346:967-989.

Vélez-Fort M, Audinat E, Angulo MC. 2009. Functional $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors of NG2-expressing cells in the hippocampus. *Glia* 57:1104-1114.

Ventura R, Harris KM. 1999. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci.* 19:6897-6906.

Vijayaraghavan S, Schmid HA, Halvorsen SW, Berg DK. 1990. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a neuronal acetylcholine receptor α -type subunit. *J Neurosci.* 10:3255-3262.

Villegas J. 1975. Characterization of acetylcholine receptors in the Schwann cell membrane of the squid nerve fibre. *J Physiol.* 249:679-689.

Wang H, Shi H, Liao SJ, Wang Z. 1999b. Inactivation gating determines nicotine blockade of human HERG channels. *Am J Physiol.* 277:H1081-H1088.

Wang H, Shi H, Wang Z. 1999a. Nicotine depresses the functions of multiple cardiac potassium channels. *Life Sci.* 65:PL143-PL149.

Wang H, Shi H, Zhang L, Pourrier M, Yang B, Nattel S, Wang Z. 2000a. Nicotine is a potent blocker of the cardiac A-type K^+ channels. Effects on cloned Kv4.3 channels and native transient outward current. *Circulation* 102:1165-1171.

Wang H, Yang B, Zhang L, Xu D, Wang Z. 2000b. Direct block of inward rectifier potassium channels by nicotine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 164:97-101.

Welsby P, Rowan M, Anwyl R. 2006. Nicotinic receptor-mediated enhancement of long-term potentiation involves activation of metabotropic glutamate receptors and ryanodine-sensitive calcium stores in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 24:3109-3118.

Wong LA, Gallagher JP. 1989. A direct nicotinic receptor-mediated inhibition recorded intracellularly in vitro. *Nature* 341:439-442.

Wonnacott S. 1997. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 20:92-98.

Xiu J, Nordberg A, Zhang JT, Guan ZZ. 2005. Expression of nicotinic receptors on primary cultures of rat astrocytes and up-regulation of the $\alpha 7$, $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits in response to nanomolar concentrations of the β -amyloid peptide₁₋₄₂. *Neurochem Int.* 47:281-290.

Xu J, Yang W, Zhang G, Gu Q, Lee LY. 2007. Calcium transient evoked by nicotine in isolated rat vagal pulmonary sensory neurons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 292:L54-L61.

Yamate CL, Poitry S, Perrottet P, Veuthey AL. 1997. The nutritive function of glia is regulated by signals released by neurons. *Glia* 21:84-91.

Yamazaki Y, Hamaue N, Sumikawa K. 2002. Nicotine compensates for the loss of cholinergic function to enhance long-term potentiation induction. *Brain Res.* 946:148-152.

CAPÍTULO 10: ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Concentración de nicotina en función del tiempo después del consumo de diversos productos de tabaco	5
Figura 2. Distribución de los receptores nicotínicos	10
Figura 3. Esquema de la formación hipocampal de rata y respuestas generadas en astrocitos por actividad neuronal.....	16
Figura 4. Astrocitos en cultivo de la región CA1 de hipocampo ..	38
Figura 5. Respuestas eléctricas generadas por nicotina en astrocitos de hipocampo	40
Figura 6. La nicotina aumenta la corriente iónica de los astrocitos	43
Figura 7. La nicotina disminuye la corriente saliente en astrocitos de hipocampo	45
Figura 8. La nicotina activa receptores nicotínicos en astrocitos de hipocampo	48
Figura 9. Inhibición de corrientes iónicas por nicotina	51
Figura 10. Inhibición de las corrientes de potasio por nicotina	55

Figura 11. Concentraciones bajas de nicotina inhiben las corrientes de potasio	57
Figura 12. La nicotina aumenta la concentración de calcio libre intracelular en cultivos confluentes de astrocitos	60
Figura 13. La nicotina aumenta la concentración de calcio libre intracelular en astrocitos asilados	63
Figura 14. Agonistas de receptores nicotínicos generan aumentos de la concentración de calcio intracelular en astrocitos	65
Figura 15. Aumento de la concentración de calcio intracelular por nicotina en presencia de antagonistas de receptores nicotínicos y por tetraetilamonio	68
Figura 16. Aumento de la concentración de calcio intracelular con aplicaciones prolongadas de nicotina, en presencia de antagonistas de receptores nicotínicos ..	70
Figura 17. Esquema que representa los efectos de la nicotina en los astrocitos de hipocampo	80
Figura 18. Estructura de los receptores de acetilcolina de tipo nicotínico	84
Figura 19. Estructura de canales de potasio, activados por voltaje, y de rectificación entrante.	88