

UCH-FC
Doc. B
1828

C.1

INHIBICION INDUCIDA POR ODORANTES EN NEURONAS

OLFATORIAS DE *Caudiverbera caudiverbera*.

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Biología.

FACULTAD DE CIENCIAS

por

Bernardo Enrique Morales Muñoz

Santiago, Noviembre de 1995

Director de Tesis: Dr. Juan Bacigalupo Vicuña.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Bernardo Enrique Morales Muñoz

ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Ciencias con mención en Biología, en el examen de defensa de Tesis rendido el 29 de Agosto de 1995.

Director de Tesis:

Dr. Juan Bacigalupo V.

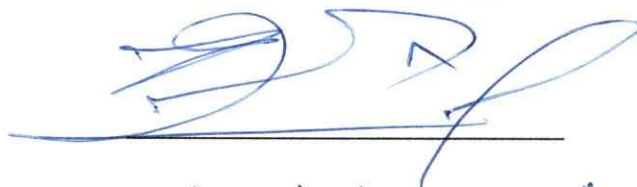


Comisión de Evaluación de la Tesis

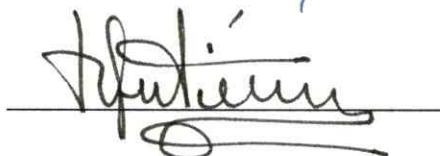
Dr. Mario Luxoro



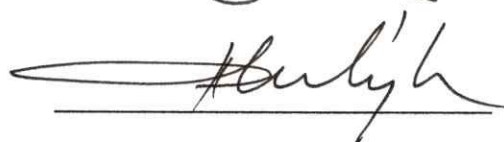
Dr. Patricio Zapata



Dr. Orlando Gutiérrez



Dr. Benjamín Suárez-Isla



... a Clarys, Pablo y también Cristóbal
mi familia

... Ello es, Horacio, que en el cielo y la
tierra hay más de lo que pueda soñar
tu filosofía.

Hammllet

William Shakespeare

AGRADECIMIENTOS

Primero deseo expresar el gran honor que ha significado para mí el formar parte del prestigioso Laboratorio de Fisiología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. En él encontré las fuentes de inspiración que en todo momento me dieron la fuerza para seguir adelante en el apasionante mundo de la Ciencia.

Mis agradecimientos al Dr. Juan Bacigalupo, mi profesor patrocinante y mi amigo. Gracias a su apoyo hoy puedo decir que he cumplido una etapa más en este andar.

Al Dr. Ramón Latorre por haberme abierto las puertas de este Laboratorio y por su gran interés en el desarrollo de esta Tesis.

Al Dr. Osvaldo Alvarez por su incondicional ayuda y certeros consejos.

Al Dr. Pedro Labarca por su constante aporte de ideas en la perfección de este trabajo de Tesis.

A los Drs. Daniel Wolf, Cecilia Vergara y Ximena Cecchi por su amistad y su interés en este trabajo.

A los que hicieron agradable mi permanencia en el Laboratorio, mis amigos: Rodolfo Madrid, Ricardo Delgado, Carlos Maureira, Hugo Sáez, Claudia Basso, José García,

Marcelo Rojas y Luisa Soto. A través de la persona de Juan Espinoza quiero simbolizar mi gratitud para con aquellas personas que ya no están en este Laboratorio.

Deseo expresar un especial agradecimiento a Gonzalo Ugarte, amigo de siempre que durante todo momento me brindó su apoyo. También debo agradecer a Patricia Hidalgo mi compañera de programa y a Felipe Díaz por entregarme su amistad y comprensión.

También vayan mis agradecimientos a CONICYT que por medio de la Beca para Doctorados y los proyectos FONDECYT 90-1116, 1930859 y 2930018 y al Centro de Estudios Científicos de Santiago (CECS) que por su Beca de Matrícula y Aranceles, me brindaron la ayuda económica sin la cual me hubiese sido imposible cumplir este sueño.

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCION	1
Antecedentes Bibliográficos	4
1. Organización celular del epitelio olfatorio	4
2. Mecanismo molecular de la quimiotransducción olfatoria	6
2.1. Proteínas receptoras de odorantes en las neuronas olfatorias	6
2.2. Participación de proteína G en la quimiotransducción olfatoria	7
2.3. La cascada del AMP cíclico en la quimiotransducción olfatoria	9
2.4. Canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos en neuronas olfatorias	11
2.5. Corrientes de receptor inducidas por odorantes	12

2.6.	La cascada del IP_3 en el mecanismo de quimiotransducción olfatoria.	14
3.	Conductancias dependientes del potencial en neuronas olfatorias	17
4.	Respuesta inhibitoria en neuronas olfatorias	18
	OBJETIVOS	21
	METODOS	23
1.	Disociación de las neuronas olfatorias	23
2.	Soluciones de disociación y cultivo	25
3.	Registros electrofisiológicos	25
3.1.	Fabricación de las pipetas de registro	26
3.2.	Sistema de registro	27
3.3.	Registro de la actividad eléctrica asociada a los potenciales de acción	29
3.4.	Registro de corrientes iónicas totales	29
3.5.	Registro de voltaje	30
4.	Procedimiento experimental	31

4.1.	Estimulación química de las neuronas olfatorias	31
4.2.	Determinación de la concentración de odorantes a nivel de la célula	33
4.3.	Soluciones usadas en los protocolos experimentales	37
5.	Análisis de los resultados	39
6.	Lista de reactivos y su procedencia	41
	RESULTADOS	42
	I. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y PROPIEDADES ELECTROFISIOLOGICAS DE LAS NEURONAS OLFATORIAS AISLADAS	43
1.	Morfología de las neuronas olfatorias aisladas	43
2.	Propiedades eléctricas pasivas de las neuronas olfatorias	44
3.	Actividad eléctrica espontánea en neuronas olfatorias aisladas	46
4.	Corrientes dependientes de voltaje en neuronas olfatorias	50

II. RESPUESTA EXCITATORIA INDUCIDA POR ODORANTES QUE ACTIVAN LA ADENILIL CICLASA	53
1. Incremento de la actividad eléctrica inducida por odorantes de la mezcla I	53
2. Corriente de transducción inducida por odorantes excitatorios	54
3. Potencial de receptor excitatorio inducido por odorantes de la mezcla I	56
4. Relación corriente-voltaje de la corriente inducida por odorantes excitatorios	57
III. RESPUESTA INHIBITORIA INDUCIDA POR ODORANTES QUE NO ACTIVAN LA CASCADA DEL AMP CICLICO	59
1. Inhibición de la actividad eléctrica inducida por odorantes de la mezcla II.	59
2. Respuesta inhibitoria y excitatoria en una misma neurona olfatoria	60
3. Corriente de salida inducida por odorantes de la mezcla II en neuronas olfatorias aisladas	64

4.	Hiperpolarización y despolarización inducida por odorantes en neuronas olfatorias	69
5.	Caracterización de la corriente de salida inducida por odorantes de la mezcla II	73
5.1	Relación dosis-respuesta de la corriente de salida inducida por odorantes	73
5.2	Relación corriente-voltaje de la corriente inducida por odorantes de la mezcla II	76
5.3.	Bases iónicas de la corriente de salida dependiente de odorantes	78
5.3.1.	Selectividad a K^+ de la corriente de salida inducida por odorantes	78
5.3.2.	Selectividad al ion Cl^- de la corriente de salida dependiente de odorante	79
5.3.3.	Efecto del TEA sobre la corriente de salida inducida por odorantes	82
6.	Inhibición de la actividad eléctrica inducida por pulsos de corriente	84
7.	Localización ciliar de la respuesta inhibitoria inducida por odorantes	86
8.	La conductancia de K^+ responsable de la respuesta inhibitoria inducida por odorantes es activada por Ca^{2+}	88
8.1.	Caracterización de la corriente de K^+ que participa en la respuesta inhibitoria inducida por odorantes	88
8.1.1.	Curvas I-V de la corriente de K^+ inhibitoria inducida por odorantes	88
8.1.2.	Sensibilidad a caribdotoxina de la corriente de K^+ inhibitoria inducida por odorantes	90

8.1.3. El potencial de receptor inhibitorio es bloqueado por CTX	92
9. Rol del Ca^{2+} externo en la respuesta inhibitoria inducida por odorantes	94
9.1. Efecto del Ca^{2+} externo sobre la conductancia de K^{+} inducida por odorantes	94
9.2. Sensibilidad a nifedipina de la corriente inhibitoria inducida por odorantes	94
9.3. Sensibilidad a nifedipina del potencial de receptor hiperpolarizante inducido por odorantes	96
10. Corriente de Ca^{2+} inducida por odorantes inhibitorios	99
DISCUSION	101
1. Fenómeno inhibitorio inducido por odorantes	102
1.1. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas olfatorias aisladas en la ausencia de estímulo químico	102
1.2. Inhibición de la actividad eléctrica inducida por odorantes	104
2. Respuestas excitatorias e inhibitorias inducidas por odorantes en una misma neurona olfatoria.	106
3. Conductancia involucrada en la generación del fenómeno inhibitorio	108

3.1	Importancia fisiológica de la corriente de K^+ inducida por odorantes	112
3.2.	Sitio de la quimiotransducción	113
4.	Mecanismo de quimiotransducción de los odorantes inhibitorios	113
4.1.	Función del calcio	113
4.2.	Inositol 1,4,5-trisfosfato	118
4.3.	Un modelo del mecanismo de transducción de odorantes inhibitorios	121
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	124

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Generación de segundos mensajeros en respuestas a diferentes odorantes	16
Tabla 2. Soluciones de cultivo	25
Tabla 3. Soluciones utilizadas en las diferentes condiciones experimentales	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del neuroepitelio de la mucosa olfatoria de vertebrado	6
Figura 2. Esquema de la cascada bioquímica que opera en la transducción de odorantes excitatorios.	15
Figura 3. Representación esquemática del sistema de registro	28
Figura 4. Esquema del arreglo experimental usado en este trabajo	32
Figura 5. Curva de calibración para determinar la concentración de odorante que llega a la célula	36
Figura 6. Distribución de intervalos de tiempo entre potenciales de acción	40
Figura 7. Microfotografía de una neurona olfatoria aisladas	45
Figura 8. Registro de potenciales de acción espontáneos	48
Figura 9. Aumento de la actividad espontánea de potenciales de acción inducida por pulsos de voltaje	49
Figura 10. Corrientes dependientes de voltaje presentes en las neuronas olfatorias	52
Figura 11. Actividad eléctrica y corriente de entrada activadas por odorantes de la mezcla I	55
Figura 12. Relación I-V de la corriente activada por odorantes excitatorios	58

Figura 13. Inhibición de la actividad eléctrica inducida por la mezcla II en neuronas olfatorias aisladas	61
Figura 14. Respuestas inhibitorias y excitatorias inducidas por odorantes en una misma neurona olfatoria	62
Figura 15. Corriente de salida inducida por odorantes de la mezcla II en neuronas olfatorias aisladas	66
Figura 16. Corriente de salida inducida por odorantes de la mezcla II en neuronas olfatorias aisladas de <i>Xenopus laevis</i>	67
Figura 17. Inhibición de la actividad eléctrica y activación de una corriente de salida gatillada por odorantes de la mezcla II en una misma neurona olfatoria	68
Figura 18. Corriente de salida e hiperpolarización inducidas por la mezcla II en una misma neurona olfatoria	71
Figura 19. Efecto diferencial de la mezcla I y II sobre corrientes totales y potencial de membrana en una misma neurona olfatoria	72
Figura 20. Dosis-respuesta de la corriente de salida inducida por la mezcla II	75
Figura 21. Relación I-V de la corriente activada por odorantes de la mezcla II	77
Figura 22. Selectividad a K^+ de la corriente de salida inducida por la mezcla II	80
Figura 23. Efecto del gradiente de Cl^- sobre la corriente de salida inducida por odorantes	81
Figura 24. Efecto del TEA sobre la corriente de salida inducida por la mezcla II	83
Figura 25. Inhibición de la actividad eléctrica inducida por pulsos de	

corrientes en neuronas olfatorias aisladas	85
Figura 26. Localización del efecto inhibitorio inducido por la mezcla II en neuronas olfatorias de sapo	87
Figura 27. Relación I-V de la corriente de K^+ inhibitoria inducida por odorantes de la mezcla II	89
Figura 28. Efecto del CTX sobre la corriente de salida inducida por odorantes de la mezcla II	91
Figura 29. Efecto del CTX sobre el potencial de receptor hiperpolarizante inducido por odorantes de la mezcla II	93
Figura 30. Efecto del Ca^{2+} externo sobre la corriente de salida inducida por odorantes de la mezcla II	95
Figura 31. Efecto de la nifedipina sobre la corriente dependiente de odorantes	97
Figura 32. Efecto de la nifedipina sobre el potencial de receptor hiperpolarizante inducido por la mezcla II	98
Figura 33. Corriente de entrada de Ba^{2+} inducido por la mezcla II	100
Figura 34. Aumento del Ca^{2+} en la región apical de neuronas olfatorias inducido por la mezcla II	116
Figura 35. Modelo del mecanismo que podría operar en la quimiotransducción de los odorantes de la mezcla II	123

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

AMPc : Adenosina-3,5-monofosfato cíclico

ATP : Adenosintrisfosfato

CTX : Caribdotoxina

GMPc : Guanosina-3,5-monofosfato cíclico

GΩ : Gigaohm, 10⁹ ohm

g : Conductancia

Hz : Hertz

I : Corriente

IP₃ : Inositol (1,4,5)-trisfosfato

M : Molar (moles/litro de solución)

mV : Milivolts, 10⁻³ Volts

μM : Micromolar, 10⁻⁶ Molar

μm : Micrómetros, 10⁻⁶ metros

nM : Nanomolar, 10⁻⁹ Molar

pA : Picoampere, 10⁻¹² Amperes

PA : Potenciales de Acción

pF : Picofaradio, 10^{-12} Faradio
pS : Picosiemens, 10^{-12} Siemens = 10^{12} mho
s : Segundos
tc : Tiempo crítico
TEA : Tetraetilamonio
V : Volts

RESUMEN

Los primeros eventos de la percepción olfativa se inician en células especializadas llamadas neuronas olfatorias. Estas células sensoriales responden con un aumento en la frecuencia de potenciales de acción al ser expuestas a odorantes que estimulan la adenilil ciclasa en cilios olfatorios. Esta respuesta es mediada por una cascada enzimática en la cual el AMP cíclico participa como mensajero secundario. El AMP cíclico activa por acción directa una conductancia catiónica ciliar, generándose el potencial de receptor excitatorio responsable del aumento en la descarga de potenciales de acción. Sin embargo, un grupo importante de odorantes, pertenecientes principalmente a la clase pútridos y solventes orgánicos, no tienen efecto sobre la adenilil ciclasa, sugiriendo que la transducción de estos odorantes podría operar a través de una vía diferente a la cascada del AMP cíclico. La respuesta electrofisiológica producida por esta clase de odorantes no había sido investigada previamente.

Por otro lado, estudios electrofisiológicos en la década de los 60 permitieron proponer que ciertos odorantes inhiben la descarga de potenciales de acción en neuronas olfatorias de vertebrados. La validez de estos resultados fue cuestionada por muchos investigadores, lo que hizo que cayeran en el olvido. Recientemente, estudios realizados

en neuronas olfatorias aisladas de *Necturus* han revalidado la idea de la existencia del fenómeno inhibitorio.

El objetivo de esta Tesis fue investigar la respuesta que generan los odorantes que no estimulan la adenilil ciclasa y estudiar el mecanismo que opera en la transducción de estos odorantes usando la técnica de *patch clamp* en neuronas olfatorias aisladas de vertebrado. Para esto las células fueron estimuladas con dos mezclas de odorantes: una compuesta por odorantes que son potentes activadores de la adenilil ciclasa (mezcla I), y otra, formada por odorantes que no afectan la actividad de esta enzima (mezcla II).

Los resultados obtenidos demuestran lo siguiente:

- i.- Que las neuronas olfatorias aisladas de *Caudiverbera caudiverbera* y *Xenopus laevis* responden a odorantes que activan la adenilil ciclasa con un aumento en la descarga de potenciales de acción de igual forma que la de otros anfibios.
- ii. Que la mezcla compuesta por odorantes que no activan la ciclasa inducen una inhibición de varios segundos en la descarga de potenciales de acción. Este efecto de los odorantes de la mezcla II demuestra por primera vez en forma clara la existencia del fenómeno inhibitorio en neuronas olfatorias de vertebrados.
- iii. Que una misma neurona responde con aumento en la frecuencia de potenciales de acción al ser estimulada con la mezcla I y con una inhibición a la mezcla II. Esto

demuestra por primera vez en forma directa que una misma neurona es capaz de responder excitatoria e inhibitoriamente, de acuerdo al estímulo a la que es expuesta.

iv. Se encontró que la inhibición en la descarga de potenciales de acción es producida por la generación de un potencial de receptor hiperpolarizante, el que a su vez es inducido por una corriente de salida dependiente de odorantes.

v. Se identificó y caracterizó la conductancia responsable de inhibir la descarga de potenciales de acción, como una conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} .

vi. Se muestran evidencias que sugieren que la transducción de los odorantes que inhiben la descarga de potenciales de acción operaría por una vía diferente a la del AMP cíclico. Se estableció que el ion Ca^{2+} actúa como un intermediario en esta cascada enzimática, activando la corriente de K^+ .

De los resultados es posible concluir que las neuronas olfatorias poseen al menos dos mecanismos de quimiotransducción que involucran la participación de segundos mensajeros: uno asociado a los odorantes excitatorios y otro a los odorantes inhibitorios. Ambos mecanismos pueden coexistir en una misma célula.

ABSTRACT

The first steps on olfactory perception occur in specialized cells called olfactory neurons. These sensory cells respond with an increase in their action potential firing frequency upon stimulation with odorants that activate the adenylyl cyclase in olfactory cilia. This response is mediated by an enzyme cascade in which cyclic AMP plays a role as a second messenger. Cyclic AMP directly activates a ciliary cationic conductance, generating the excitatory receptor potential responsible for the increase in the action potential firing. However, a considerable number of odorants, mainly belonging to the putrid class plus some organic solvents, does not affect adenylyl cyclase, suggesting that transduction of these odorants could work through an enzyme cascade different than the cyclic AMP pathway. The electrophysiological response induced by such odorants had not been previously investigated.

On the other hand, electrophysiological studies performed in the sixties led to the proposal that certain odorants inhibit action potential firing in vertebrate olfactory neurons. The validity of those results was questioned, and eventually they were forgotten. Recently, studies performed in olfactory neurons isolated from *Necturus* revalidated the idea of the inhibitory phenomenon induced by odorants.

The aim of this Thesis was to investigate the electrical response generated by those odorants that do not stimulate adenylyl cyclase and to study the mechanism underlying transduction of these odorants, by using the *patch clamp* technique on isolated vertebrate olfactory neurons. Cells were stimulated with two odorant mixtures: one composed of odorants which are potent activators of adenylyl cyclase (mixture I), and another one made of odorants that do not affect the activity of this enzyme (mixture II).

The results of the present Thesis led to the following conclusions:

- i.- Olfactory neurons isolated from *Caudiververa caudiververa* and *Xenopus laevis* respond to odorants that activate adenylyl cyclase with an increase in action potential firing, as in other amphibia.
- ii.- The mixture composed of odorants that do not activate adenylyl cyclase induce an inhibition in action potential firing lasting several seconds. This is the first clear demonstration of the existence of odorant-triggered inhibition in vertebrate olfactory neurons.
- iii.- A single neuron can respond with an increase in action potential firing frequency upon stimulation with mixture I and with a decrease in firing to mixture II. This directly demonstrates, for the first time, that the same neuron is able to elicit both, excitatory

or inhibitory responses, depending on the nature of the chemical stimulus.

iv.- It was found that inhibition of action potential firing is due to the generation of an hyperpolarizing receptor potential, which is induced in turn by an odorant-dependent outward current.

v.- The conductance responsible for inhibiting the firing of action potentials was identified and characterized as a Ca^{2+} -activated K^+ conductance.

vi.- The evidence shown suggests that the mechanism underlying odorant-induced inhibition could work through a pathway different from the cyclic AMP pathway. It was established that Ca^{2+} ion acts as an intermediary in this enzyme cascade, by activating the K^+ conductance.

From the above results it is possible to conclude that olfactory neurons have at least two different chemotransduction mechanisms involving the participation of second messengers: one, a cyclic AMP cascade, is associated to the excitatory responses and another one, whose mediator is still unresolved, is associated to the inhibitory responses. Both mechanisms may coexist in a single olfactory receptor cell.

INTRODUCCION

La olfacción involucra la respuesta al reconocimiento de una variedad de agentes químicos de bajo peso molecular llamados odorantes. Este sentido es esencial para la existencia de muchas especies de vertebrados, pues éstas dependen de señales químicas provenientes de su entorno para muchas de sus funciones vitales. Hay especies del reino animal que son capaces de percibir un universo importante de odorantes. Por ejemplo, el ser humano es capaz de percibir alrededor de 10^4 diferentes tipos de odorantes, y es posible que este número sea aún mayor en especies como el perro y el conejo.

Los primeros eventos de la fisiología del olfato se inician en los cilios de células especializadas en la detección de odorantes, llamadas neuronas o células olfatorias. Estudios bioquímicos han demostrado que una fracción considerable de los odorantes estimulan la formación de adenosín-3,5-monofosfato cíclico (AMPC) en preparaciones de cilios (Pace y cols., 1985; Sklar y cols., 1986; Boekhoff y Breer, 1990), sugiriendo la participación de éste como mensajero secundario en la quimiotransducción olfatoria. Evidencias bioquímicas y electrofisiológicas posteriores han permitido conocer con claridad los intermediarios que participan en este proceso de transducción. Este es iniciado por la unión de agentes odorantes a proteínas receptoras localizadas en la

membrana de los cilios olfatorios (Buck y Axel, 1991; Ngai y cols., 1993a). La unión activa la enzima de membrana adenilil ciclasa a través de una proteína que liga GTP, específica de neuronas olfatorias, denominada G_{olf} (Pace y cols., 1985; Lancet, 1986; Sklar y cols., 1986; Jones y Reed, 1989; Breer y cols., 1990; Firestein y cols., 1991b). La activación de la adenilil ciclasa eleva los niveles intracelulares de AMPc (Pace y cols., 1985; Sklar y cols., 1986; Boekhoff y Breer, 1990; Schmidt y Monasterio, 1990), el cual por acción directa activa una corriente de entrada catiónica inespecífica (Nakamura y Gold, 1987; Firestein y cols., 1991a, 1991b; Zufall y cols., 1991a) y otra de Cl^- (Kleene y Gesteland, 1991; Kurahashi y Yau, 1993), generándose el potencial de receptor que induce un aumento en la frecuencia de potenciales de acción.

Los estudios bioquímicos realizados en preparaciones de membranas de cilios olfatorios también demostraron que un importante grupo de odorantes no eleva los niveles de AMPc (Pace y cols., 1985; Sklar y cols., 1986). Evidencias recientes obtenidas por cinética rápida revelaron que este grupo de odorantes induce un aumento del inositol (1,4,5)-trisfosfato (IP_3) en la preparación de cilios olfatorios, sugiriendo un papel de este mensajero en la quimiotransducción olfativa (Breer y cols., 1990; Boekhoff y Breer, 1990; Breer y Boekhoff, 1991; Breer y Boekhoff, 1992). De modo que dos sistemas de mensajeros secundarios parecen estar involucrados en la quimiotransducción olfatoria, desconociéndose el papel fisiológico del último de ellos.

Por otro lado, estudios electrofisiológicos realizados a fines de la década de los años 60, usando técnicas de registro extracelular en la mucosa olfatoria, sugirieron que ciertos odorantes inhiben la actividad eléctrica de las neuronas olfatorias de vertebrados

(Gesteland y cols., 1965; O'Connell y Mozell, 1969). Evidencias recientes, obtenidas mediante la técnica del *patch clamp*, en neuronas aisladas de *Necturus* (Dionne, 1992) y en células individuales del epitelio del pez gato (Kang y Caprio, 1995), han confirmado la idea que las neuronas olfatorias de vertebrados son capaces de responder con una inhibición de su actividad eléctrica al ser estimuladas con algunos aminoácidos (odorantes para estos animales). Se desconoce el mecanismo de transducción responsable de esta respuesta. En esta Tesis se ofrecen las primeras evidencias acerca de la naturaleza de las conductancias de membrana involucradas en esta respuesta inhibitoria y algunas ideas acerca de cómo podría operar este mecanismo.

Antecedentes Bibliográficos

El estudio de la transducción química en el olfato recibió un impulso decisivo del trabajo de Ottoson (1956), en que éste demostró que en presencia de agentes odoríferos es posible registrar una respuesta eléctrica en el epitelio olfatorio, mediante una técnica que ha recibido el nombre de electroolfatograma. Dos importantes contribuciones del trabajo de Ottoson que deben ser mencionadas son: en primer lugar, su demostración de que los primeros eventos de la percepción de odorantes que ocurren en el epitelio olfatorio son de naturaleza eléctrica y, en segundo lugar, su conclusión que la comprensión de los eventos de quimiotransducción en el olfato requiere forzosamente conocer las propiedades de las neuronas olfatorias. Sin embargo, la secuencia de eventos moleculares involucrados en la transducción olfatoria permanecieron ignorados durante años. Solo recientemente, gracias al desarrollo de la técnica del *patch clamp*, de la biología molecular y de nuevas técnicas bioquímicas se han llegado a conocer los intermediarios que participan en la transducción de odorantes excitatorios.

1. Organización celular del epitelio olfatorio

Los primeros pasos de la recepción olfativa se realizan en la mucosa olfatoria. Esta mucosa es un neuroepitelio del tipo columnar pseudoestratificado, mitóticamente

activo, lo que permite una regeneración celular continua. Este neuroepitelio está compuesto por tres tipos de células: sustentaculares, basales y neuronas olfatorias (figura 1). Estas últimas son neuronas quimiosensoriales primarias especializadas en la detección de odorantes. Son células bipolares desde cuyo soma se proyecta una larga dendrita hacia la superficie del epitelio la que despliega un ensanchamiento en su extremo distal, el botón dendrítico. De éste nacen un número variable de cilios, con estructura microtubular clásica $9 + 2$. El extremo basal del soma proyecta un delgado axon amielínico que atraviesa la lámina criboide del hueso etmoides y entra al bulbo olfatorio, donde hace sinapsis con las dendritas de las células mitrales. En esta zona se produce la primera integración de la información proveniente de las neuronas olfatorias, en el complejo proceso de la sensación olfativa. A su vez, los axones de las células mitrales terminan en la corteza olfatoria.

Las células sustentaculares tienen forma de botella, se extienden a todo lo ancho del neuroepitelio olfatorio y presentan microvellosidades en el extremo apical. Estas son células de sostén que rodean las neuronas olfatorias y en anfibios, además, contribuyen a la formación de la matriz del mucus extracelular.

Finalmente, las células basales del neuroepitelio son células redondas que se localizan en las proximidades de la membrana basal y constituyen la reserva neurogénica del epitelio. La pérdida de las neuronas olfatorias debido a daños producidos por su exposición al medio ambiente o por senescencia promueve la división de una población de células basales, que se conocen con el nombre de *células globosas*.

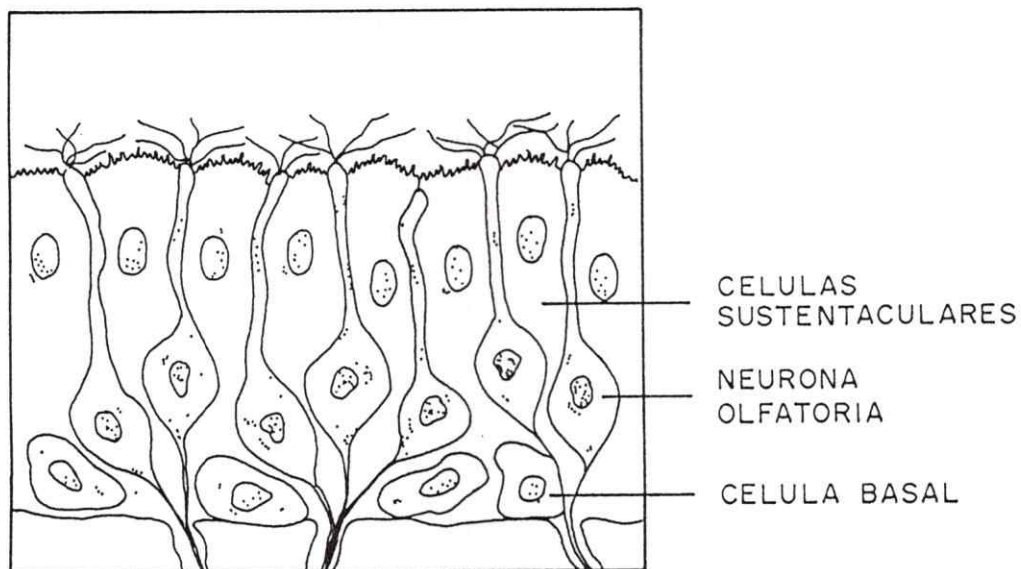


Figura 1. Esquema del neuroepitelio de la mucosa olfatoria de vertebrado. Se puede observar las diferentes células que componen el epitelio olfatorio.

2. Mecanismos moleculares de la quimiotransducción olfatoria.

2.1. Proteínas receptoras de odorantes en las neuronas olfatorias.

La quimiotransducción se inicia con la interacción de odorantes con proteínas receptoras específicas localizadas en la membrana de los cilios olfatorios. Estudios bioquímicos (Rhein y Cagan, 1983) y neurofisiológicos (Caprio y Byrd, 1984) realizados en peces y la existencia de ciertas anosmias (incapacidad de percibir ciertos olores) en el ser humano (Lancet, 1991) hacían suponer la participación de receptores a odorantes en la transducción olfatoria (Bruch y Teeter, 1989).

La contribución más relevante acerca de la presencia de receptores a odorantes en vertebrados provino del trabajo de Buck y Axel (1991) en neuronas olfatorias de la rata. El hecho que la activación de la adenilil ciclasa por odorantes fuese mediada por proteína G condujo a estos autores a la idea que los receptores a odorantes pudieran pertenecer a la superfamilia de los así llamados *receptores acoplados a proteína G*. Empleando partidores derivados de varios receptores pertenecientes a esta superfamilia, ellos clonaron y caracterizaron 18 miembros diferentes de una familia multigénica que codifican proteínas con siete dominios transmembranales y cuya expresión está restringida al epitelio olfatorio. Recientemente, mediante hibridación *in situ*, se demostró que la expresión de estos receptores está localizada en el extremo apical del epitelio olfatorio (Ressler y cols., 1993; Vassar y cols., 1993). Una familia más pequeña de genes (aproximadamente 100) que codifican receptores a odorantes fue identificada en el pez gato (Ngai y cols. 1993a). Estos se expresan en un pequeño número y con una distribución al azar dentro del epitelio olfatorio (Ngai y cols., 1993b). El conjunto de evidencias demuestran claramente la participación de receptores proteicos específicos a odorantes en la quimiotransducción olfatoria.

2.2. Participación de proteínas G en la quimiotransducción olfatoria.

La participación de proteínas G como intermediario en la transducción olfatoria fue sugerida inicialmente por Lancet (1986) sobre la base de evidencias bioquímicas

obtenidas en preparación de cilios olfatorios de rana (Pace y cols., 1985). El grupo de Lancet encontró que el aumento de la actividad de la adenilil ciclasa inducida por odorantes en esta preparación dependía de GTP, lo cual implicaba la participación de una proteína G. La movilidad electroforética y la ADP-ribosilación catalizada por la toxina del cólera permitieron demostrar que esta proteína es semejante a la proteína G_s encontrada en otros sistemas celulares (Pace y cols., 1985; Sklar y cols., 1986). La secuencia de aminoácidos de la subunidad α de esta proteína mostró un 88% de identidad con la G_s de otros sistemas, motivo por el cual se la clasificó como una proteína diferente. Más tarde se encontró que la expresión de esta proteína está restringida al epitelio olfatorio (Jones y Reed, 1989) por lo que se la denominó G_{olf} . Por otro lado, se ha confirmado la presencia de proteínas G_i y G_o en cilios olfatorios de rana (Pace y cols., 1985), pez gato (Bruch y cols., 1988) y sapo chileno (Schmidt y Monasterio, 1990), pero el papel que éstas cumplen en la transducción olfatoria es aún desconocido.

Los registros de corrientes totales en neuronas olfatorias aisladas, realizados por Firestein y colaboradores (1991a), demostraron que el GTP- τ -S (análogo del GTP resistente a la hidrólisis), agregado en la pipeta de *patch clamp*, prolongaba la corriente de entrada inducida por odorantes.

Las evidencias muestran que las proteínas G cumplen una importante función en la quimiotransducción olfatoria, acoplando receptores activados por odorantes con enzimas que aumentan los niveles citosólicos de mensajeros secundarios.

2.3. La cascada del AMPc en la quimiotransducción olfatoria.

La identificación del AMPc como posible mensajero secundario en la olfacción provino de evidencias electrofisiológicas, de acuerdo a las cuales análogos de este nucleótido e inhibidores de la fosfodiesterasa (enzima que hidroliza el AMPc) alteraban el potencial inducido por odorantes en el epitelio olfatorio (Kurihara y Koyama, 1972; Menevse y cols., 1977). La confirmación bioquímica de la participación del AMPc en la transducción olfatoria se obtuvo a mediados de los años 80 con el desarrollo de métodos para obtener preparaciones de membranas derivadas de los cilios olfatorios (Rhein and Cagan, 1980; Anholt y cols., 1986). Se ha encontrado que un grupo importante de odorantes, entre los que se cuentan odorantes florales, frutales y herbáceos, estimulan entre un 30 y un 65 % por sobre la actividad basal la formación de AMPc en la preparación de cilios olfatorios. Sin embargo, otro grupo importante de odorantes, integrado principalmente por odorantes pútridos y alcoholes, no elevaron el AMPc (Pace y cols., 1985; Sklar y cols., 1986). Estos resultados llevaron a Lancet (1986) a proponer un modelo según el cual la quimiotransducción es mediada por una activación de la adenilil ciclasa, la cual aumenta los niveles del mensajero secundario AMPc. Otras dos importantes contribuciones de los trabajos de Pace y colaboradores y de Sklar y colaboradores son las siguientes: 1) que los odorantes pueden ser clasificados en aquellos olores que activan la adenilil ciclasa y aquéllos que no activan esta enzima y, 2) la más importante, que el mecanismo que opera en la transducción de un grupo importante de odorantes sería diferente de aquél que opera para los olores que

activan la adenilil ciclasa. Recientemente, estos resultados han sido confirmados empleando la técnica de cinética rápida en preparaciones de cilios olfatorios de rata (Breer y cols., 1990; Boekhoff y Breer, 1990; Breer and Boekhoff, 1991), pez gato (Restrepo y cols., 1993), así como antenas de insectos (Breer y cols., 1991) y en condiciones de estado estable en el sapo chileno (Schmidt y Monasterio, 1990). En los estudios de cinética rápida, algunos odorantes en presencia de ATP y GTP inducen un aumento rápido y transitorio en la formación de AMPc. El aumento alcanza su máximo 50 ms después de aplicado el estímulo, para luego decaer a niveles ligeramente superiores al basal, con tiempos de relajación del orden de 300 ms. El retardo en la formación de AMPc es consistente con la demora observada en la respuesta electrofisiológica de neuronas olfatorias estimuladas con odorantes (Firestein y cols., 1991a y 1991b).

La participación del AMPc en la transducción olfatoria tiene su complemento en la evidencia derivada de estudios electrofisiológicos en que se usó la técnica del *patch clamp*. La aplicación externa de análogos de nucleótidos cíclicos permeables a la membrana incrementan la frecuencia de potenciales de acción (Frings y Lindemann, 1991; Morales y cols., 1994). Por otro lado, la 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, inhibidor de la fosfodiesterasa) adicionada a la pipeta de registro prolonga la corriente de entrada inducida por odorantes en neuronas olfatorias aisladas (Firestein y cols., 1991a).

2.4. Canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos en neuronas olfatorias.

Los registros de corriente en parches escindidos de la membrana de cilios olfatorios demostraron directamente la presencia de una conductancia catiónica gatillada por nucleótidos cíclicos en neuronas olfatorias (Nakamura y Gold, 1987). La perfusión de la cara interna del parche de membrana con AMPc o GMPc produce un incremento rápido y reversible en la conductancia de la membrana. El potencial de inversión de la corriente activada por nucleótidos cíclicos fue aproximadamente de 0 mV, semejante al potencial de inversión de la corriente inducida por odorantes (Nakamura y Gold, 1987; Trotier y Macleod, 1983). Estos resultados sugieren que los nucleótidos cíclicos participan en el proceso de quimiotransducción, activando directamente canales iónicos presentes en la membrana de los cilios olfatorios. Sin embargo, estos experimentos, en los que no se observaron fluctuaciones unitarias de canales, no permitieron establecer si los canales sensibles a nucleótidos cíclicos corresponden a los mismos canales que son activados durante el proceso de transducción olfativa. Esto fue demostrado por Firestein y colaboradores (1991b) en neuronas olfatorias de salamandra. Primero, los autores registraron mediante la modalidad de célula adherida a la pipeta, eventos únicos de un canal catiónico de 40 pS en la dendrita de las células olfatorias (zona donde la densidad de canales es menor, permitiendo este tipo de registro), cuya actividad aumentó al exponer las células a odorantes. Luego, el parche de membrana fue escindido de la célula y la cara interna expuesta a AMPc o GMPc. Ambos nucleótidos cíclicos activaron el mismo canal que antes mostró sensibilidad a odorantes (Firestein y cols., 1991b;

Zufall y cols., 1991a). El gen que especifica al canal activado por nucleótidos cíclicos de neuronas olfatorias de vertebrados ha sido clonado y expresado en ovocitos de *Xenopus laevis* (Dahllan y cols., 1990; Ludwig y cols., 1990; Goulding y cols., 1992), conservándose las propiedades de conductancia, dependencia de voltaje y sensibilidad a nucleótidos cíclicos del canal nativo.

2.5. Corrientes de receptor inducidas por odorantes.

La primera evidencia directa de corrientes activadas por odorantes fue obtenida por Trotier (1986) en neuronas olfatorias aisladas de salamandra. Al estimular estas células con concentraciones micromolares de una mezcla de isoamilacetato y butanol, éstas respondieron con la activación de una corriente de receptor excitatorio cuya curva I-V fue lineal en el rango ± 100 mV, invirtiendo a un potencial cercano a 0 mV; esto es consistente con una conductancia selectiva a cationes.

Estudios posteriores realizados en neuronas olfatorias aisladas de diferentes vertebrados, en condiciones de potencial controlado, han demostrado que la corriente de entrada inducida por pulsos cortos de odorantes (50-1000 ms) que activan la adenilil ciclase comienza a desarrollarse 150-1000 ms después de la aplicación del estímulo, alcanza un valor máximo en aproximadamente 50 ms, para luego decaer a niveles basales con una constante de tiempo de 0.8-1.3 s (Firestein y Werblin, 1989; Firestein y cols., 1990; Morales y cols., manuscrito en preparación). La latencia de la corriente

gatillada por los odorantes está de acuerdo con las evidencias bioquímicas de que la generación del potencial de receptor es precedida por una cascada enzimática en la que participa el AMPc como mensajero secundario.

La participación del AMPc en el desarrollo de la corriente de receptor excitatorio se ha demostrado dializando nucleótidos cíclicos en el interior de la neurona olfatoria a través de la pipeta de *patch clamp*. En estas condiciones, el AMPc induce una corriente de entrada con las mismas características de la corriente activada por odorantes excitatorios (Kurahashi, 1990; Firestein y cols., 1991a). La aplicación externa de análogos de nucleótidos cíclicos que se hidrolizan lentamente y que atraviesan la membrana (8-Br-AMPc o 8-Br-GMPc), también inducen una corriente de entrada con estas características (Morales y cols., manuscrito en preparación). La corriente de entrada gatillada por nucleótidos cíclicos es portada principalmente por iones Ca^{2+} y Na^{+} (para revisión, ver Zufall y cols., 1994), permitiendo de esta forma un aumento del Ca^{2+} intracelular. Recientemente se ha descrito una conductancia de Cl^{-} activada por Ca^{2+} en cilios olfatorios de rana (Kleene y Gesteland, 1991), que también contribuye a la generación del potencial de receptor excitatorio (Kurahashi y Yau, 1993).

El conjunto de evidencias bioquímicas, electrofisiológicas y de biología molecular presentadas aquí permiten concluir que las neuronas olfatorias, al ser expuestas a odorantes que activan la adenilil ciclasa, activan una cascada enzimática que permite el aumento de los niveles citosólicos de AMPc. Este mensajero secundario activa directamente una conductancia catiónica inespecífica e indirectamente una corriente de Cl^{-} dependiente de Ca^{2+} , que generan el potencial de receptor excitatorio. Esta

despolarización de la neurona olfatoria es capaz de activar conductancias dependientes de voltaje, induciendo de esta forma el aumento en la frecuencia de potenciales de acción observado al estimular las neuronas olfatorias con odorantes excitatorios. La figura 2 muestra un esquema del mecanismo propuesto que operaría en la transducción de odorantes que activan la adenilil ciclasa.

2.6. La cascada del IP_3 en el mecanismo de quimiotransducción olfatoria.

La activación de la fosfolipasa C inducida por odorantes en preparaciones de cilios olfatorios de pez gato sugirió la participación del IP_3 en la quimiotransducción olfatoria (Huque y Bruch, 1986). Los estudios realizados en esta misma preparación han demostrado que la L-alanina y la L-arginina (odorantes para ésta especie) estimulan la producción de IP_3 , con concentraciones inferiores a las requeridas para activar la adenilil ciclasa. Este aumento también se ha observado con GTP y análogos de éste resistentes a la hidrólisis en la ausencia de estímulo, sugiriendo la participación de una proteína G en este mecanismo de transducción.

Estudios recientes de cinética rápida en cilios olfatorios de vertebrados ha demostrado que aquellos odorantes que no estimulan la producción de AMPc, entre los que destacan los de la clase pútridos y solventes orgánicos, estimulan la producción de IP_3 (Breer y cols., 1990; Boekhoff y Breer, 1990; Breer y Boekhoff, 1991; Restrepo y cols., 1993). En tanto, los odorantes que sí estimulan la producción de AMPc no afectan

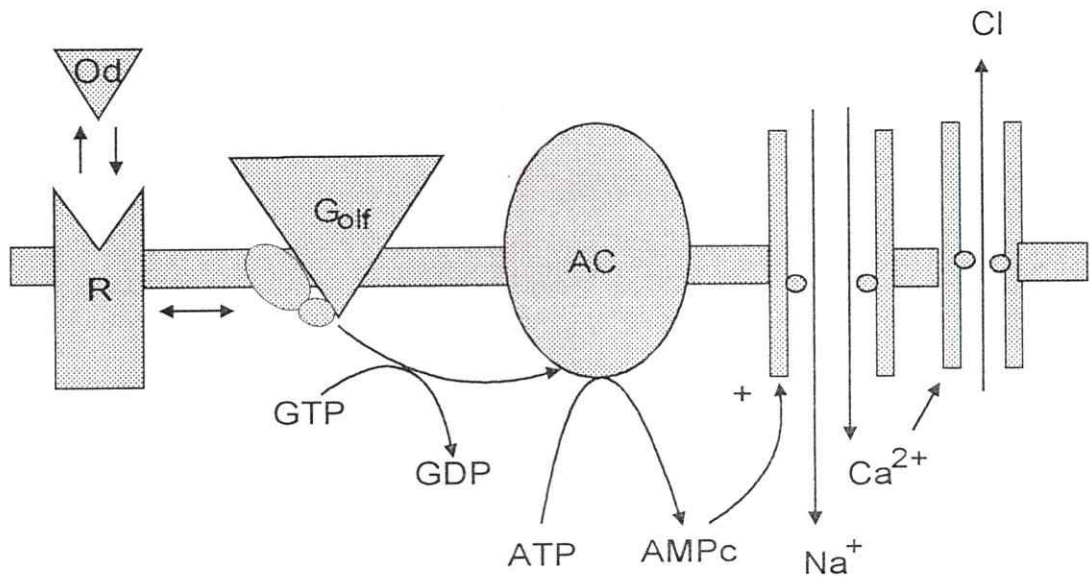


Figura 2. Esquema que representa la cascada bioquímica que opera en la transducción de odorantes excitatorios. En este esquema O representa las moléculas de odorantes, R a receptores a odorantes, G_{olf} proteína G y AC adenilil ciclasa.

los niveles de IP₃ (tabla 1). El aumento en la producción de IP₃ activada por odorantes, tales como pirazina (odorante pútrido), es similar al mostrado por el AMPc. Este alcanza un máximo 25-50 ms después de aplicado el estímulo y decae a un nivel basal alrededor de los 500 ms (Breer y cols., 1990; Boekhoff y Breer, 1990). La relajación en la producción de IP₃ se debe a la acción de una proteína cinasa C (Boekhoff y Breer, 1992). El aumento de IP₃ inducido por odorantes es bloqueado por la toxina pertussis, lo que indica la participación de proteínas G_o o G_i (Boekhoff y cols., 1990). La confirmación electrofisiológica de la participación del IP₃ en la transducción olfatoria

Odorantes	AMP cíclico	IP ₃
Florales		
Hedione	108 ± 21	6 ± 7
* Geraniol	62 ± 25	6 ± 7
Acetofenona	36 ± 8	4 ± 6
Feniletilalcohol	16 ± 9	8 ± 7
Lilial	1 ± 2	106 ± 22
Frutales		
* Citralva	100	4 ± 7
Citraldimetilacetal	63 ± 10	3 ± 5
* Citronelal	61 ± 7	3 ± 5
Citronelacetato	62 ± 10	1 ± 1
Liral	0	100
Herbaceos		
Eugenol	70 ± 18	4 ± 4
Isoeugenol	49 ± 13	2 ± 3
Etilvanilina	0	63 ± 15
Pútridos		
Furfurilmercaptano	37 ± 9	8 ± 7
* Trietilamina	4 ± 2	141 ± 60
Feniletilamina	6 ± 2	137 ± 78
Pirrolidina	0	70 ± 25
* Acido isovalérico	0	68 ± 24
* Pirazina	0	98 ± 32

Tabla 1. Generación de segundos mensajeros en respuesta a diferentes odorantes. Los datos para la generación de esta tabla se obtuvieron de Breer y Boekhoff, 1991. Las mediciones fueron realizadas después de la aplicación de 1 μ M de odorantes y se expresan como porcentajes de los efectos inducidos por citralva y liral, respectivamente. Los asteriscos indican los odorantes empleados en esta Tesis para formar las diferentes mezclas.

aún no ha sido claramente establecida. Estudios de célula completa bajo corriente controlada demostraron que el IP₃ adicionado a la pipeta de registro induce una despolarización transitoria en neuronas aisladas de pez gato (Restrepo y cols., 1990; Miyamoto y cols., 1992b), la cual es bloqueada por rojo de rutenio, conocido

bloqueador de canales de Ca^{2+} sensibles a ryanodina del retículo sarcoplasmático de músculo (Miyamoto y cols., 1992b). Estas evidencias, sumadas al hecho que L-aminoácidos inducen una corriente de Ca^{2+} en neuronas olfatorias aisladas de pez gato (Restrepo y cols., 1990), sugieren que el IP_3 media la respuesta excitatoria activando una conductancia de Ca^{2+} en la membrana plasmática. Mas aún, canales iónicos provenientes presumiblemente de cilios olfatorios de pez gato, e incorporados en bicapas formadas en la punta de la pipeta de *patch clamp*, son activados por IP_3 (Restrepo y cols., 1992). Sin embargo, ningún efecto de IP_3 ha sido observado en neuronas olfatorias de salamandra (Firestein y cols., 1991a) y de rana (Lowe y Gold, 1993)

Las evidencias presentadas en esta sección sugieren que en la transducción de los odorantes operan dos mecanismos que utilizan mensajeros secundarios: uno en el que participa el AMPc y otro en el que participa el IP_3 . Hay mayor controversia sobre la participación de este último.

3. Conductancias dependientes del potencial en neuronas olfatorias.

La información recibida por el epitelio olfatorio es conducida al sistema nervioso central codificada como patrones de potenciales de acción. Por tal motivo, es de gran importancia estudiar las conductancias que participan en la regulación de la actividad eléctrica en las neuronas olfatorias de vertebrados, ya que ésto permitirá definir aquellas conductancias involucradas en la formación de estos patrones.

Las neuronas olfatorias responden a una amplia variedad de odorantes, de manera dosis-dependiente, con un aumento en la frecuencia de potenciales de acción (Getchell y Shepherd, 1978a y 1978b; Morales y cols., manuscrito en preparación). En la generación del potencial de acción en estas células participan cinco corrientes dependientes de voltaje: una de entrada transitoria portada por Na^+ , una de entrada mantenida portada por Ca^{2+} y tres de salida portadas por K^+ (Firestein y Werblin, 1987; Trotier, 1986). Entre las corrientes portadas por K^+ se han caracterizado: una correspondiente a las así llamadas *corrientes tipo A* que se inactiva, otra semejante al rectificador tardío y una tercera correspondiente a una conductancia sensible a Ca^{2+} . Las neuronas olfatorias de *C. caudiverbera* sólo presentan estas dos últimas conductancias de K^+ (Delgado y Labarca, 1993).

4. Respuesta inhibitoria en neuronas olfatorias.

Los estudios electrofisiológicos con electrodos extracelulares en mucosas olfatorias de vertebrados demuestran que ciertos agentes odoríferos inhiben la actividad eléctrica espontánea (Gesteland y cols., 1965; O'Connell y Mozell, 1969). En neuronas olfatorias de rana, O'Connell y Mozell (1969) encontraron que sólo 1 de 101 células analizadas respondió con una inhibición en la descarga de potenciales de acción al ser estimuladas con $181 \mu\text{M}$ de dietil carbonato. En salamandra, Getchell y Shepherd (1978a) encontraron 5 neuronas olfatorias, de un total de 50 estimuladas con odorantes,

que respondieron con una inhibición en la frecuencia de potenciales de acción (desde una actividad basal de 1 Hz a menos de 0.33 Hz). En todos los estudios realizados en ese período, las respuestas inhibitorias se observaron en un porcentaje muy bajo de los ensayos (Gesteland y cols., 1965; O'Connell y Mozell, 1969; Duchamp y cols., 1974; Revial y cols., 1978; Getchell y Shepherd, 1978a), razón por la cual muchos investigadores cuestionaron la existencia de la inhibición olfativa en vertebrados, atribuyendo dichos resultados a cambios locales en la concentración iónica de las células. Esto hizo que la idea del fenómeno inhibitorio cayera en el olvido. Debe mencionarse que estos estudios en general se realizaron en neuronas con frecuencia espontánea muy baja, condición poco adecuada para observar inhibición. Todo el interés estaba centrado en la respuesta excitatoria, por lo cual se escogían neuronas con baja actividad basal. Sin embargo, hay evidencias recientes, obtenidas en neuronas olfatorias aisladas de vertebrado, que han revalidado la idea que las neuronas olfatorias son capaces de generar respuestas inhibitorias. En *Necturus*, Dionne (1992), usando la técnica del *patch clamp* en la modalidad de célula adherida a la pipeta, observó que un gran porcentaje de neuronas olfatorias estimuladas con una mezcla de aminoácidos, responden con una inhibición de la actividad eléctrica. Un efecto similar se ha observado en ciertas neuronas olfatorias del pez gato, estimuladas con L-arginina o L-glutamato (Ivanova y Caprio, 1993). Los registros reproducidos en estos estudios no son convincentes en demostrar la respuesta inhibitoria, ya que nuevamente escogen neuronas con una frecuencia espontánea muy baja. Recientemente Kang y Caprio (1995), realizando un estudio *in vivo* en pez gato, demostraron en forma clara que ciertos

aminoácidos inducen inhibición de la descarga de potenciales de acción, pero no muestran evidencias sobre el mecanismo involucrado en esta respuesta.

Dionne (1992), en el mismo estudio referido anteriormente, encontró que la misma mezcla que supuestamente inhibe la actividad eléctrica induce una hiperpolarización de las células olfatorias, sugiriendo que la inhibición implica la generación de un potencial de receptor hiperpolarizante, aunque la corriente responsable de este potencial no fue definida. En neuronas de salamandra se ha encontrado que hay conductancias de Cl^- y K^+ moduladas por odorantes, sugiriéndose que éstas podrían estar involucradas en la generación del potencial de receptor hiperpolarizante en vertebrados (Miyamoto y cols., 1992; Dubin y Dionne, 1994).

La respuesta inhibitoria a olfactantes ha sido claramente establecida en invertebrados. Las neuronas olfatorias de langosta marina, al ser estimuladas con L-aminoácidos, responden con un potencial de receptor hiperpolarizante, producto de un aumento en la conductancia al K^+ (McClintock y Ache, 1989; Fadool y cols., 1993; Michel y Ache, 1994). Resultados similares se han obtenido en abeja (Akers, 1992).

Las evidencias presentadas anteriormente no demuestran concluyentemente la existencia del fenómeno inhibitorio en neuronas olfatorias de vertebrados, así como tampoco los mecanismos responsables de esta inhibición.

En esta Tesis se establece la existencia de inhibición inducida por olfactantes en neuronas olfatorias de vertebrados, como también la conductancia responsable de este efecto. Parte de los resultados obtenidos en este trabajo han sido ya publicados (Morales y cols., 1994 y 1995).

OBJETIVOS

Los antecedentes presentados en el capítulo anterior indican que los odorantes que estimulan la formación de AMPc en cilios olfatorios inducen un aumento en la frecuencia de potenciales de acción en neuronas olfatorias de vertebrados. Este aumento es el resultado de la activación de una cascada enzimática que concluye con el AMPc como mensajero secundario. Este aumenta la conductancia de la membrana, generando el potencial de receptor excitatorio que determina el aumento en la descarga de potenciales de acción. Por otro lado, evidencias bioquímicas han demostrado que un importante grupo de odorantes, pertenecientes principalmente a la clase pútridos, no tiene efecto sobre la enzima adenilil ciclasa. Esto sugiere que la transducción de estos odorantes podría operar a través de un mecanismo diferente al de los odorantes excitatorios. Sin embargo, la respuesta eléctrica producida por odorantes pútridos no ha sido caracterizada. Sobre la base de estos antecedentes se planteó como hipótesis de trabajo que los odorantes que no activan la adenilil ciclasa inducen una respuesta electrofisiológica diferente a la generada por odorantes excitatorios. La confrontación experimental de esta hipótesis contempla estudiar dicha respuesta usando la técnica del *patch clamp* en neuronas olfatorias aisladas de anfibios.

Específicamente se propuso:

1. Obtener una preparación de neuronas olfatorias aisladas de *C. caudiverbera* que conservaran sus propiedades fisiológicas intactas.
2. Caracterizar la respuesta electrofisiológica de estas neuronas a odorantes que estimulan la adenilil ciclasa.
3. Caracterizar el efecto de odorantes que no activan la adenilil ciclasa, sobre la actividad eléctrica de neuronas olfatorias aisladas.
4. Identificar y caracterizar las conductancias responsables del efecto inhibitorio inducido por esta última clase de odorantes.
5. Identificar posibles intermediarios que participaran en la transducción de estos agentes odoríferos, estudiando específicamente aquéllos que contribuyen a la activación de la(s) conductancia(s) responsable(s) del efecto inhibitorio.

MÉTODOS.

1. Disociación de las neuronas olfatorias.

Las neuronas olfatorias aisladas se obtuvieron del epitelio olfatorio del sapo chileno *Caudiverbera caudiverbera* y del sapo africano *Xenopus laevis* siguiendo el procedimiento descrito por Frings y Lindemann (1988). Los animales se sacrificaron por descerebración y desmedulación, pasando un estilete a la altura de la sexta vértebra cervical. La cavidad nasal se removió desde la región frontal de la cabeza a través de dos cortes aplicados en ángulos de 45° respecto al eje de simetría de la cabeza. Luego, la cavidad nasal se abrió y las mucosas olfatorias ventral y dorsal de ambas fosas nasales se removieron.

Las mucosas se colectaron en una solución de Ringer hipertónico (tabla 2), en donde permanecieron por 10 minutos a temperatura ambiente. Esto permite eliminar el mucus del epitelio olfatorio. Enseguida, las mucosas se cortaron en trozos de 1 mm² y se pusieron en solución de disociación (tabla 2) por 45 minutos a temperatura ambiente. Luego, los trozos de mucosa se lavaron 3 veces con solución hipertónica a una temperatura de 4°C y se repartieron en seis placas de cultivo que contenían 2 ml de

solución hipertónica suplementada con 1% de albúmina, 0.03 mg/ml de leucina, 0.20 mg/ml de glutamina, 0.10 u.i./ml de estreptomicina y 0.10 u.i./ml de penicilina. Las placas de cultivo se mantuvieron a 4°C durante 3 días. La solución hipertónica con 1% de albúmina, permite retardar la pérdida de la forma de las neuronas olfatorias, que frecuentemente se produce en estas células al ser mantenidas en cultivos primarios (Trotier, 1986). Las soluciones se prepararon inmediatamente antes de ser usadas.

Durante las sesiones experimentales, los trozos de tejido de una placa fueron trasladados a un tubo Eppendorf y bañados con solución Ringer normal (tabla 2). Estos trozos fueron pasados suavemente 3 a 5 veces a través de la punta pulida de una pipeta Pasteur. Este procedimiento permite obtener un número elevado de neuronas aisladas. Al microscopio estas neuronas presentaron su forma bipolar clásica (ver figura 6) y su movimiento ciliar característico.

El procedimiento empleado para aislar neuronas del epitelio olfatorio tiene la ventaja que no utiliza tratamiento enzimático, reduciendo así alteraciones que éstas pudiesen producir en componentes de la maquinaria de quimiotransducción.

2. Soluciones de disociación y cultivo.

Componentes	Solución Hipertónica	Solución de Disociación	Ringer normal
NaCl	120	100	120
NaOH	4	4	-
KCl	3	2.5	2.5
CaCl ₂	1	1	1
MgCl ₂	2	-	0.4
Na ₂ CO ₃	-	10	-
Na ₃ -citrato	-	10	-
HEPES	10	-	5
Albúmina %	-	1	-
Glucosa	5	-	5
Na-piruvato	5	-	-
pH	7.4	10.3	7.4
mOsm	265	254	255

Tabla 2. Soluciones utilizadas para el aislamiento de las neuronas olfatorias. El pH de las soluciones fue ajustado con NaOH. Las concentraciones son expresadas en mM.

3. Registro electrofisiológico.

El estudio de la quimiotransducción olfatoria se realizó electrofisiológicamente, usando la técnica del *patch clamp* en sus diferentes configuraciones (Hamill, y cols., 1981). Esta técnica consiste en establecer un sello de alta resistencia eléctrica ($> 1 \text{ G}\Omega$) entre la punta de un microelectrodo y la membrana de una célula. Esto permite registrar corriente o voltaje en células tan pequeñas como son las neuronas olfatorias. Las configuraciones utilizadas durante el desarrollo de esta Tesis fueron: la de célula adherida a la pipeta de registro (*cell attached*) y la de célula completa (*whole cell*) en

las modalidades de potencial controlado y corriente controlada.

3.1 Fabricación de las pipetas de registro.

Las pipetas de registro se confeccionaron estirando capilares de vidrio para hematocrito ("Blu-Tip"), mediante un estirador de pipetas vertical (700 C, David Kopf Instruments, Tujunga, California). El estiramiento se realizó en dos etapas. En la primera, el capilar se estiró en aproximadamente 1 cm haciendo pasar por el filamento de nicrom (níquel y cromo) una corriente eléctrica de 15 A. En la segunda etapa el filamento de nicrom se calentó con 13.5 A, hasta que el capilar se separó en dos pipetas cuyo diámetro interno fue cercano a 1 μm . Luego del estiramiento, la región distal de la pipeta fue recubierta con un polímero hidrofóbico hasta aproximadamente 100 μm de la punta (Sylgard 184, Dow Corning Co. Midland, Michigan), con el propósito de disminuir su capacidad eléctrica. La resistencia de las pipetas se midió en la cámara experimental, aplicando pulsos rectangulares de potencial de 0.2 mV entre el electrodo de registro Ag/AgCl contenido en la pipeta y el electrodo Ag/AgCl de tierra. De la relación entre el voltaje aplicado y la corriente medida se calculó el valor de la resistencia de las pipetas empleadas, que fue típicamente de 2 M Ω .

3.2 Sistema de registro.

El sistema de registro utilizado en esta Tesis se muestra en la figura 3. Este sistema consta de: un porta cabezal o "headstage", modelo CV-4, y un amplificador de *patch clamp*, modelo Axopach-1D (Axon Instruments Inc., Foster City, California), un osciloscopio de dos canales (Hitachi modelo V-1212), un registrador de video cassette VHS con sistema de grabación digital (PCM), un registrador de papel termosensible, una tarjeta análoga-digital/digital-análoga de 100 MHz (LabMaster, Scientific Solutions Inc.) y un computador AT provisto con programas pCLAMP 5.5 (Axon Instruments, Inc.).

Las neuronas olfatorias aisladas mediante el procedimiento descrito anteriormente, fueron trasladadas a una cámara experimental y bañadas con 250 μ l de Ringer normal. Las células fueron visualizadas mediante un microscopio invertido Nikon TMS equipado con óptica de Hoffmann, empleando un lente objetivo de 40X. El electrodo de registro montado en el cabezal fue ingresado al baño de la cámara experimental mediante el desplazamiento efectuado por micromanipuladores motorizados, controlados a distancia (Newport Corporation, California). La disposición de los manipuladores motorizados en los portadores multi-ejes permitieron el movimiento controlado en los ejes X, Y, Z, y un desplazamiento en 45° con respecto al eje X. Antes de intentar sellarse, se compensó la diferencia de potencial entre los electrodos. Luego la pipeta de registro se acercó a una neurona olfatoria hasta obtenerse un sello de alta resistencia. La señal de corriente proveniente de la célula a través del

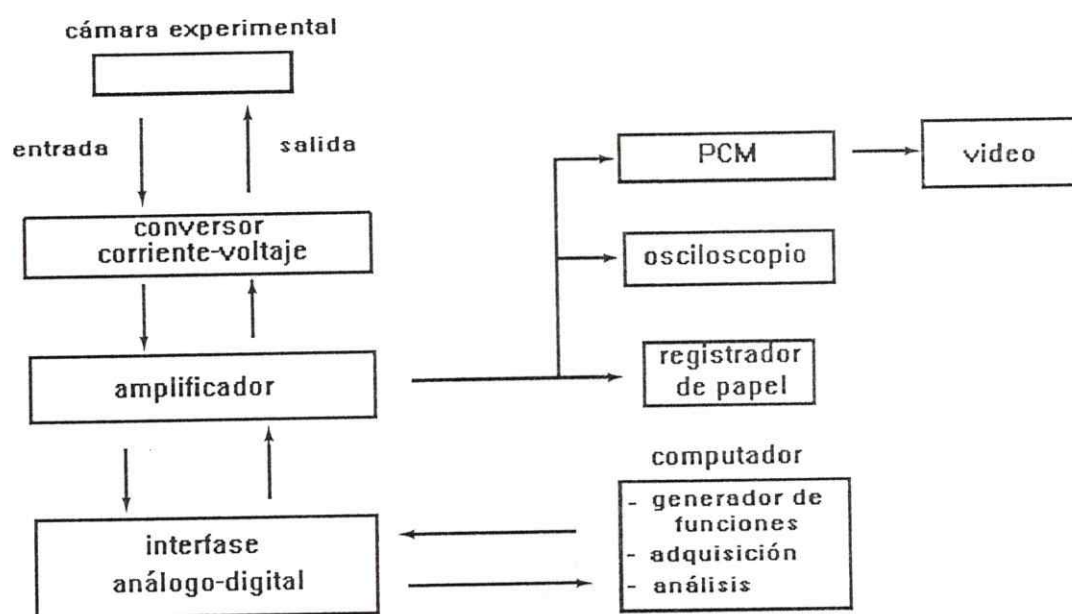


Figura 3. Representación esquemática del sistema de registro utilizado en el desarrollo de esta Tesis. Las flechas indican el sentido de la señal, desde que es registrada en la célula hasta su grabación para el posterior análisis.

electrodo de registro (Ag/AgCl), es amplificada y convertida a voltaje por el amplificador del cabezal. La resistencia de retroalimentación de este amplificador fue de $1\text{ G}\Omega$, por lo tanto, por cada 1 pA de corriente que este recibe, el convertor entrega a la salida un voltaje de -1 mV . La actividad de potenciales de acción fue observada simultáneamente en un osciloscopio y en un registrador de papel. Además, estas señales analógicas fueron digitalizadas con un modulador digital (PCM) y grabadas en una cinta de video para su posterior análisis. Las corrientes y voltajes fueron también observados en el osciloscopio y adquiridas en el disco duro de un computador AT a través del

programa Clampex del pCLAMP 5.5, digitalizadas previamente por medio de la tarjeta LabMaster.

3.3 Registro de la actividad eléctrica asociada a los potenciales de acción.

La actividad eléctrica de las neuronas olfatorias se caracteriza por la generación de potenciales de acción (PA). Para registrar esta actividad eléctrica, se usó la técnica del *patch clamp* en la modalidad de célula adherida a la pipeta de registro. Esto permite registrar las corrientes asociadas a los potenciales de acción, principalmente como corrientes capacitivas del parche de membrana (Fenwick y cols. 1982).

3.4 Registro de corrientes iónicas totales.

Las corrientes iónicas totales se registraron mediante la técnica de *patch clamp* en la modalidad de célula completa bajo potencial controlado (Hamill y cols., 1981). Una vez formado el sello de alta resistencia, se aplicó al electrodo de registro un potencial de -70 mV y se procedió a romper el trozo de membrana circunscrito por la pipeta. Esto se llevó a cabo combinando la aplicación de presión negativa en el interior de la pipeta con pulsos de voltaje de 1 V y de 0.1-1 ms de duración. De esta forma se establece una continuidad eléctrica entre el electrodo de la pipeta y el interior de la

célula, permitiendo controlar el potencial de membrana de la neurona. Las corrientes capacitivas y la resistencia en serie fueron adecuadamente canceladas, después de establecida la modalidad de célula completa bajo potencial controlado. La resistencia en serie fue compensada en aproximadamente un 80%. En todos los experimentos realizados en la condición de potencial controlado se usó un voltaje de mantención (V_{mant}) de -70 mV. Las corrientes iónicas dependientes de potencial de toda la célula fueron inducidas por la aplicación de una serie de pulsos de voltaje desde -90 a +50 mV, separados cada 20 mV. Los protocolos de pulsos fueron generados en el computador con pCLAMP 5.5 y convertidos a forma analógica por el conversor digital-análogo de la tarjeta LabMaster.

3.5 Registros de voltaje.

Los cambios de voltaje inducidos por odorantes y pulsos de corriente se registraron mediante la técnica del *patch clamp* en modalidad de célula completa bajo corriente controlada (Hamill y cols., 1981). Esta condición de registro es una variante de la anterior. Luego de establecida la condición de registro de célula completa bajo potencial controlado (V-controlado), se cambia a la condición de corriente controlada (I-controlada). De este modo se midieron el potencial de reposo de las neuronas olfatorias, los potenciales de acción espontáneos y los cambios eléctricos inducidos por odorantes. El potencial de reposo de las neuronas olfatorias se midió fijando la corriente

(I_{mant}) en 0 pA. Los potenciales de acción inducidos por pulsos de corriente se registraron en la modalidad de corriente controlada.

4. Procedimiento experimental.

4.1 Estimulación química de las neuronas olfatorias.

Las neuronas olfatorias se estimularon con diferentes mezclas de odorantes desde una pipeta multicañón posicionada a 20 ó 40 μm de los cilios olfatorios. El diámetro de la punta de cada cañón fue de aproximadamente 2 μm . Las mezclas de odorantes se aplicaron mediante pulsos de presión de nitrógeno ultrapuro (AGA) de duración y magnitud conocidas (entre 1-15 libras por pulgada cuadrada; psi), dirigidos selectivamente a la base de cada cañón desde un aparato (picospritzer construido por el Dr. Bacigalupo) provisto de una válvula solenoide operada por el computador. El arreglo experimental utilizado se muestra en la figura 4. Las pipetas fueron adquiridas comercialmente a Frederick Haer & Co. (Brunswick, ME).

Las mezclas de odorantes fueron preparadas con concentraciones equimolares (1 mM) de los siguientes odorantes:

Mezcla I : citralva, geraniol y citronelal.

Mezcla II: ácido isovalérico, trietilamina y pirazina

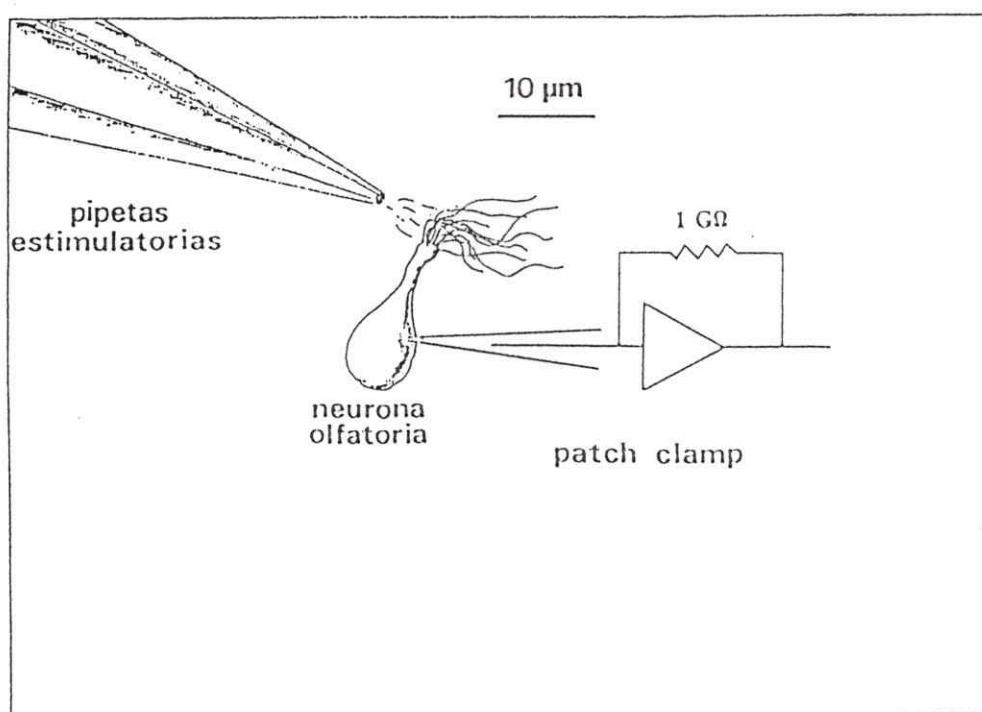


Figura 4. Esquema del arreglo experimental usado en este trabajo. Se muestra una neurona olfatoria aislada sellada a una pipeta de registro. El convertor corriente-voltaje que recibe la señal proveniente de la célula presenta una resistencia de retroalimentación de $1\text{ G}\Omega$. También se ilustra la pipeta multicañón utilizada para aplicar los odorantes.

Los odorantes que componen la mezcla I pertenecen a la clase florales y frutales que se caracterizan por ser potentes activadores de la adenilil ciclasa en preparaciones de cilios olfatorios (Pace y cols., 1985; Sklar y cols., 1986; Breer y cols., 1990; Schmidt y Monasterio, 1990). En tanto los de la clase II pertenecen a la clase pútridos y fueron elegidos entre aquéllos que no activan la cascada del AMPc. A diferencia de los olores de la mezcla I, éstos elevan considerablemente los niveles de IP_3 (ver tabla

1; Pace y cols., 1985; Sklar y cols., 1986; Boekhoff y cols., 1990; Breer y Boekhoff, 1991; Breer y cols., 1991). Las neuronas olfatorias se estimularon con mezclas de odorantes para aumentar la probabilidad de obtener una respuesta. Los tres agentes odoríferos de cada mezcla se disolvieron en las soluciones propias de cada experimento y su concentración a nivel de la célula se obtuvo como se explica a continuación.

4.2 Determinación de la concentración de odorantes a nivel de la célula.

La concentración de odorantes a nivel de la célula y el tiempo que toma el estímulo químico en alcanzar los cilios olfatorios fueron estimados por el método de Firestein y Werblin (1989). Este método se basa en la permeabilidad de las neuronas olfatorias al ion K^+ en el reposo. Sobre células cuyo potencial de membrana fue fijado en -70 mV, se aplicaron pulsos de K^+ desde un cañón de la pipeta de estímulo lleno con una solución Ringer 100 mM de K^+ (tabla 3), posicionada a 20 ó 40 μm de los cilios olfatorios. El aumento transitorio de la concentración de K^+ en el entorno de la célula induce una corriente de entrada cuya magnitud fue utilizada para determinar esta concentración. La amplitud máxima de la corriente de entrada se relaciona con la concentración de K^+ de la siguiente manera:

$$i_k = g_k (E_2 - E_1), \quad (1)$$

donde i_k es la corriente de K^+ , g_k es la conductancia, E_1 es el potencial de membrana durante el reposo y E_2 es el potencial de membrana durante el estímulo de K^+ . También tenemos que:

$$[E_2 - E_1] = 0.025 \ln (K_2/K_i) - 0.025 \ln (K_1/K_i),$$

donde, K_i es la concentración de K^+ intracelular, K_1 es la concentración de K^+ antes de aplicar el estímulo y K_2 es la concentración de K^+ durante el estímulo. Así,

$$[E_2 - E_1] = 0.025 \ln (K_2/K_1). \quad (2)$$

Reemplazando (2) en (1) tenemos:

$$i_k = g_k 0.025 \ln (K_2/K_1)$$

La conductancia de K^+ fue determinada en condiciones saturantes de K^+ . Esto se realizó aplicando pulsos de alta presión (> 15 libras por pulgada cuadrada) y de larga duración ($>$ de 2.5 s) para alcanzar en la célula una concentración de K^+ presumiblemente igual a la de la pipeta de estímulo (100 mM). Esto permite calcular g_k para cada célula de:

$$g_k = i_k/[0.025 \ln (K_2/K_1)].$$

Teniendo el valor de g_k se determinó la concentración de K^+ en la célula a partir de:

$$K_2 = K_1 \exp (i_k/0.025 g_k)$$

donde K_2 corresponde a la concentración de K^+ que llega a la célula. Conociendo la concentración de K^+ en la pipeta y la que llega a la célula, se calculó la fracción de K^+ que alcanza la célula para un pulso de presión determinado:

$$K_{\text{frac}} = [K]_{\text{cel}}/[K]_{\text{pipeta}}$$

Dado que la concentración de odorantes en la pipeta es conocida y que la fracción de odorantes que llega a la célula fue la misma que K_{frac} , entonces:

$$[O]_{\text{cel}} = K_{\text{frac}} * [O]_{\text{pipeta}}$$

De esta manera se puede estimar la concentración de odorantes que llega a la célula para un pulso de presión de intensidad y duración determinados. Con los valores de K_{frac} se confeccionaron curvas de calibración graficando K_{frac} en función de la presión aplicada a las pipetas de estímulos para eyectar la mezcla de odorantes. La figura 5 muestra una de estas curvas de calibración. La concentración de odorantes en el entorno de la célula se obtuvo por interpolación de la presión utilizada para aplicar los odorantes. Las curvas

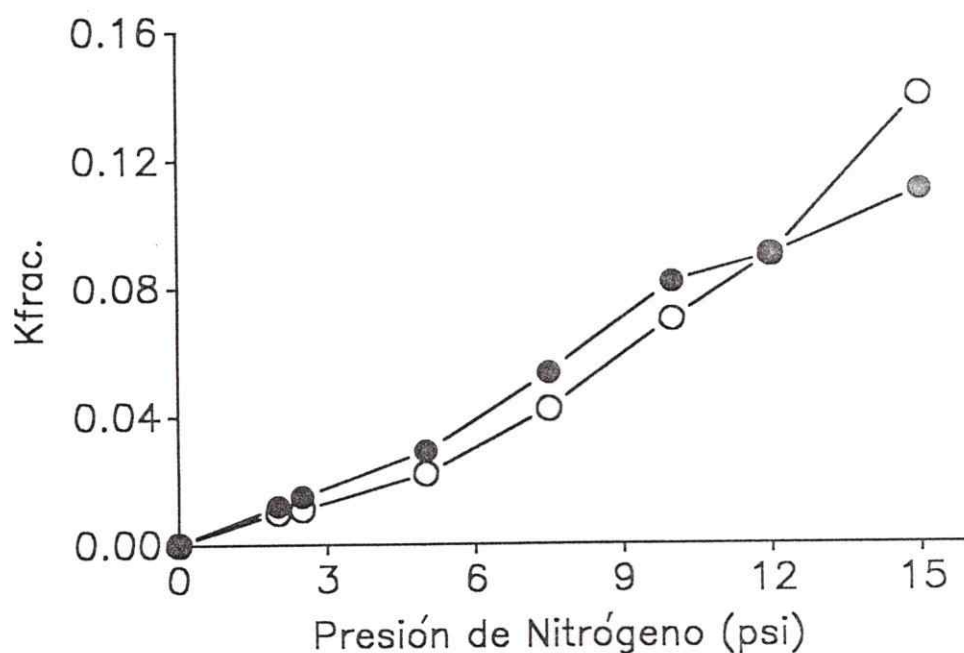


Figura 5. Curva de calibración para determinar la concentración de odorante que llega a la célula. La figura muestra un ejemplo de las curvas de calibración generadas para determinar la concentración de odorantes a nivel de la células. Estas fueron construidas a partir de las corrientes de entrada inducidas por la aplicación de pulsos de K^+ de diferente intensidad y de 40 ms de duración. El diámetro interno del cañón fue de aproximadamente $2 \mu m$. La ordenada representa al factor de dilución (K_{frac}) obtenido de la forma explicada en el texto y la abscisa representa la presión de nitrógeno, expresada en libras por pulgada cuadrada (psi), utilizada para aplicar el K^+ . Los círculos llenos corresponden a los valores calculados cuando el K^+ fue aplicado a $20 \mu m$ de la célula y los círculos abiertos al aplicarlos desde una distancia de $40 \mu m$. Cada punto representa al promedio de al menos dos pulsos.

son válidas para pipetas con una punta de aproximadamente $2 \mu m$ de diámetros y localizadas a 20 ó $40 \mu m$ de la célula. Esto se conservó a lo largo de toda la Tesis.

4.3 Soluciones usadas en los protocolos experimentales.

Para estudiar el efecto de los odorantes sobre la actividad eléctrica, las neuronas se bañaron en Ringer normal y la pipeta de registro se llenó con la misma solución.

En el estudio de las corrientes iónicas y de los cambios de potencial inducidos por odorantes, las pipetas de registro se llenaron usualmente con solución interna y las neuronas se bañaron en Ringer normal (tabla 3). En experimentos con baja concentración de Cl^- , la pipeta fue llenada con solución interna en la cual el KCl fue reemplazado parcialmente por acetato de K^+ (tabla 3).

En los experimentos con bajo K^+ externo las neuronas olfatorias se perfundieron con solución Ringer 0.25 mM de K^+ . La mezcla de odorantes usada para estimular las neuronas fue preparada en esta misma solución externa.

En los experimentos con tetraetilamonio (TEA), conocido inhibidor de canales de K^+ , la célula se perfundió con una solución en que 20 mM de NaCl del Ringer normal se reemplazó por igual cantidad de TEA- Cl . La mezcla de odorantes también fue preparada en esta misma solución.

En experimentos con bajo Ca^{2+} , la célula se bañó en solución Ringer externo en que el Ca^{2+} se reemplazó por el catión N-metil-D-glucamina (NMDG) y ajustado con el quelante de Ca^{2+} EGTA (tabla 3).

En experimentos con caribdotoxina (CTX), bloqueador de canales de K^+ activados por Ca^{2+} , y nifedipina, bloqueador de canales de Ca^{2+} del tipo L, las neuronas se perfundieron con Ringer normal suplementado con estos bloqueadores y la mezcla de

Componentes	Soluciones externas					Soluciones internas	
	Ringer normal	Solución alto K ⁺	Solución bajo K ⁺	Solución bajo Ca ²⁺	Solución Ba ²⁺	Solución interna	Solución int. bajo Cl ⁻
NaCl	120	22.5	122.2	121.5	-	-	-
KCl	2.5	100	0.25	2.5	-	120	8.4
Ac-K ⁺	-	-	-	-	-	-	111.6
MgCl ₂	0.4	0.4	0.4	1.5	1.5	1	1
CaCl ₂	1	1	1	0.23	-	1	1
HEPES	5	5	5	10	10	4	4
EGTA	-	-	-	1	-	2	2
NMDG	-	-	-	2	84.5	-	-
Na ₂ GTP	-	-	-	-	-	0.1	0.1
Mg-ATP	-	-	-	-	-	1	1
glucosa	5	5	5	5	5	-	-
BaCl ₂	-	-	-	-	10	-	-
TEA	-	-	-	-	20	-	-
pH	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6
pCa	-	-	-	8	-	7.5	7.5
I	130	130	130	134	110	150	150

Tabla 3. Soluciones utilizadas en las diferentes situaciones experimentales. El pH de las soluciones externas fueron ajustadas con NaOH, con la excepción de la solución Ba²⁺ que se ajustó con HCl. Las soluciones internas se ajustaron con KOH y aquellas en que el KCl fue reemplazado por CsCl el pH fue ajustado con CsOH. Las concentraciones son expresadas en mM. I es la fuerza iónica expresada en mM.

odorantes se preparó en estas mismas soluciones.

En los experimentos realizados para registrar la corriente de Ca²⁺ inducida por odorantes, la pipeta de registro se llenó con solución interna en que el KCl se reemplazó por CsCl y la célula fue perfundida con solución Ba²⁺, en la cual todo el NaCl y el KCl se reemplazaron por 84.5 mM NMDG y 20 mM TEA, y el Ca²⁺ por 10 mM Ba²⁺.

5. Análisis de los resultados.

El análisis de los resultados obtenidos en el estudio de la actividad eléctrica de potenciales de acción se realizó mediante el programa MULTI diseñado por el Dr. Osvaldo Alvarez y modificado para este propósito. Las señales grabadas en cinta de video fueron filtradas a 1 KHz con un filtro Bessel de 8 polos (902, Frequency Devices, Haverhill, MA), y muestreadas por un computador a 10 KHz usando el programa TOMA diseñado por el Dr. Alvarez. Las señales fueron digitalizadas a través del conversor análogo-digital de la tarjeta LabMaster. El análisis realizado por el programa MULTI de estos registros, corresponde al cálculo de la frecuencia de potenciales de acción promedio, tanto de aquéllos de generación espontánea como los inducidos por odorantes. Este programa también se utilizó para el análisis de los efectos inhibitorios. Este efecto inducido por odorantes fue definido como todos los intervalos de tiempos sin actividad eléctrica mayores que un tiempo crítico (t_c). Para esto, primero se determinaron los tiempos medios de los períodos silentes entre potenciales de acción en ausencia de odorantes, mediante análisis de distribución de intervalos, tomando una ventana de 0.2 s; para 8 experimentos este resultó ser de 0.4 s. La figura 6 muestra la distribución obtenida después de éste análisis. Luego, el t_c se definió como 9 veces este valor (3.6 s). Con los mismos propósitos, también se usaron los programa Fetchex (para adquisición) y Fetchan (para análisis) del grupo de programas pCLAMP 5.5.

Las corrientes iónicas y los cambios de voltaje fueron analizados con el programa Clampfit del grupo de programas pCLAMP versión 6. Las mediciones de amplitud de

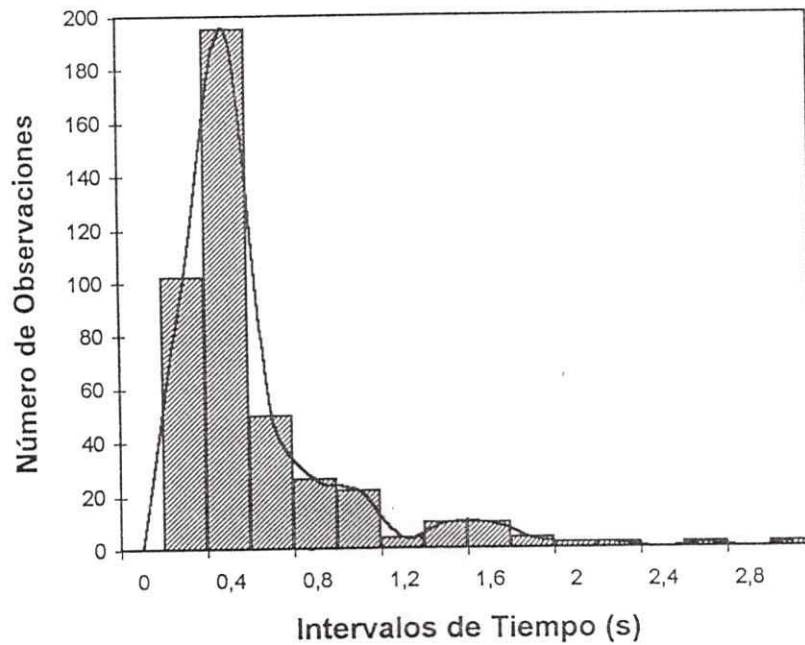


Figura 6. Distribución de intervalos de tiempo entre potenciales de acción. El histograma se construyó tomando los datos de 8 experimentos. El intervalo de tiempo para la confección de este histograma fue de 0.2 s. Se aprecia que el tiempo medio de los períodos silentes fue de 0.4 s. El tiempo crítico se definió como 9 veces el valor del tiempo medio y fue de 3.6 s.

las corrientes y de los cambios de voltaje, y los cálculos de las constantes de tiempo, fueron realizadas usando este mismo programa. Además, los ajustes de los resultados experimentales fueron realizados mediante el programa nFIT.

6. Lista de reactivos y su procedencia.

Los reactivos utilizados en esta Tesis y su procedencia son los siguientes;

Odorantes:

Citralva (3,7-dimetil-2,6-octadienenitrile)	Donado por el Dr. Robert Anholt
Citronelal (3,7-dimetil-6-octenal)	Sigma Chemical Co. St Louis, MO.
Geraniol (3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol)	"
Acido isovalérico (3-metilbutanoic acid)	"
Pirazina (1,4-diazine) y trietilamina.	"

Bloqueadores:

Caribdotoxina (CTX)	Latoxan, Rosans, Francia.
Tetraetilamonio (TEA)	Sigma Chemical Co. St Louis, MO.
Nifedipina	"

Reactivos generales:

Antibióticos

Penicilina G	"
Estreptomina	"

Aminoácidos

L-Leucina	Fisher Scientific Co. Fair Lawn, New Jersey.
L-Glutamina	Gibco Co.

Todas las sales y los solventes que no aparecen en esta lista fueron adquiridos en Sigma Chemical Company.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en esta Tesis serán presentados en tres partes. En la primera se mostrarán las características morfológicas de las neuronas olfatorias aisladas y las propiedades eléctricas pasivas y activas que presentan estas células. Con respecto a las propiedades pasivas, se darán a conocer algunos parámetros eléctricos que presentan las neuronas olfatorias aisladas del sapo chileno *C. caudiverbera*. En cuanto a las propiedades activas, se describirán la actividad eléctrica espontánea de las neuronas y las corrientes voltaje dependientes. Conocer la actividad eléctrica espontánea de las células es fundamental para entender los efectos inducidos por odorantes, ya que los agentes químicos usados en esta Tesis ejercen su efecto final modulando esta actividad. El conocimiento de las corrientes dependientes de voltaje nos permitirá distinguir estas corrientes de aquellas inducidas por odorantes. En la segunda parte se describirán los efectos de odorantes de la mezcla I sobre las propiedades eléctricas de las neuronas olfatorias. Y en la tercera parte se mostrará el efecto electrofisiológico inducido por los odorantes de la mezcla II en las neuronas olfatorias aisladas. Además, se describirán y caracterizarán las bases biofísicas de este efecto.

I. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y PROPIEDADES ELECTROFISIOLOGICAS DE LAS NEURONAS OLFATORIAS AISLADAS.

1. Morfología de las neuronas olfatorias aisladas.

Para estudiar la quimiotransducción que operan en la fisiología olfativa fue condición fundamental obtener una preparación de neuronas olfatorias aisladas que conservaran las propiedades que ellas presentan en la mucosa olfatoria. Estas células se obtuvieron del epitelio olfatorio del sapo chileno *Caudiverbera caudiverbera*, mediante manipulación mecánica en ausencia de enzimas proteolíticas (ver Métodos). Las neuronas aisladas con este procedimiento retuvieron las características morfológicas que se les ha encontrado *in situ* (figura 7). Estas conservaron su clásica forma bipolar, así como los cilios olfatorios, su cuerpo celular o soma, su dendrita y el botón dendrítico del cual se originan los cilios. El soma fue esférico u ovalado, de un diámetro que fluctuó entre los 8 y los 10 μm . De éste se extiende una dendrita de aproximadamente 1 μm de diámetro y de 15 a 35 μm de longitud, la que en su extremo distal presenta un conspicuo ensanchamiento del cual se originan entre 6 a 10 cilios. Ocasionalmente se observaron neuronas con dendritas inusualmente largas y también cortas. Los cilios, de 0.25 μm de diámetro y entre 20 a 40 μm de longitud, presentaron movimientos ondulatorios desincronizados haciendo que las células se movieran suavemente. Esta característica común en neuronas olfatorias de anfibios (Labarca y Bacigalupo, 1988;

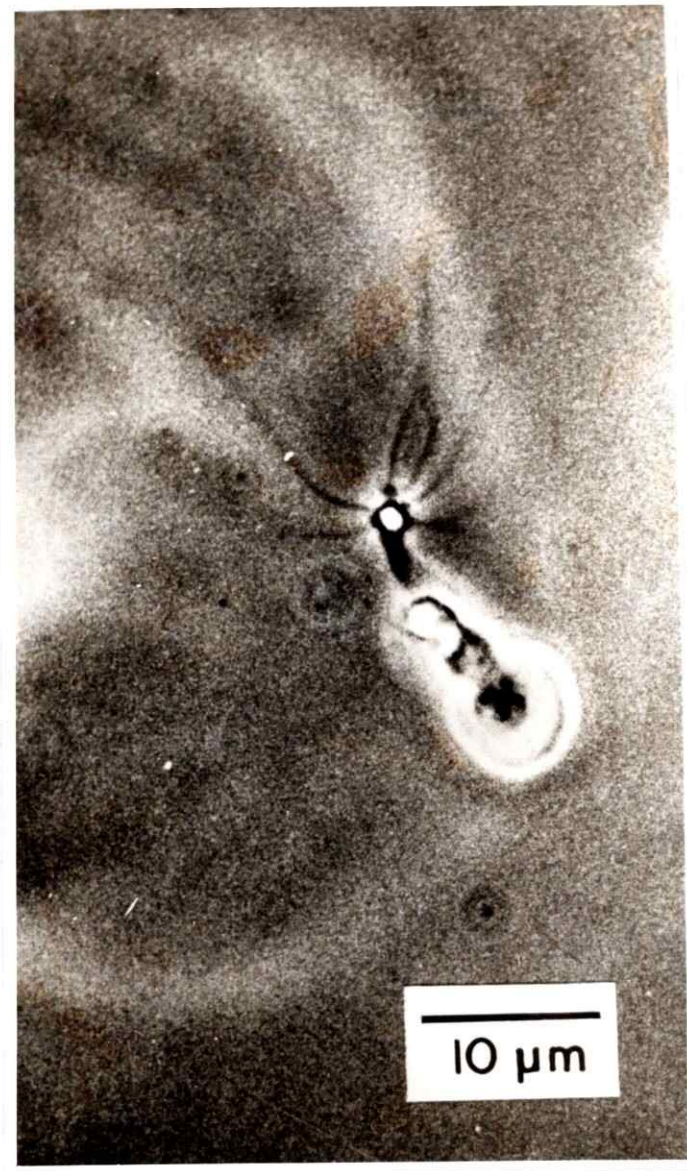


Figura 7. Microfotografía de una neurona olfatoria aislada. Microfotografía en contraste de fase (objetivo de inmersión en aceite de 100X) de una neurona disociada desde el epitelio olfatorio del sapo *Caudiverbera caudiverbera*. Se aprecian claramente el soma celular, la dendrita, el botón dendrítico y los cilios olfatorios (reproducido de Labarca y Bacigalupo, 1988).

Frings y Lindemann, 1988; Kleene y Gesteland, 1991), permitió distinguir las de otras células del epitelio. Si representamos el soma de la neurona como una esfera y la dendrita y los cilios olfatorios como cilindros, el área de la neurona olfatoria del sapo es de aproximadamente $520 \mu\text{m}^2$.

La integridad de las células aisladas fue evaluada tomando como criterio el movimiento de los cilios olfatorios, la presencia de actividad eléctrica espontánea y la capacidad de responder a odorantes.

2. Propiedades eléctricas pasivas de las neuronas olfatorias.

El estudio de los mecanismos de transducción en neuronas olfatorias aisladas de *C. caudiverbera*, comenzó examinando las propiedades eléctricas pasivas de estas células quimiosensoriales. Esto se realizó usando la técnica de *patch clamp* en la modalidad de célula completa. La capacitancia y la resistencia de entrada de la membrana fueron estimadas en condiciones de potencial controlado. Las neuronas olfatorias presentaron una capacitancia que fluctuó en un rango de 2 a 9.6 pF, con una media de 5.04 ± 1.70 pF (promedio \pm D.S.; $n=12$). Suponiendo que la capacidad específica de la membrana es de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, el área promedio calculada para la membrana celular es de $503 \pm 4.1 \mu\text{m}^2$ (promedio \pm D.S.; $n=12$), valor que se aproxima al calculado a través de las dimensiones obtenidas bajo el microscopio. Esto indica que las neuronas olfatorias de sapo son más pequeñas que las neuronas olfatorias de salamandra ($2000 \mu\text{m}^2$; Firestein

y Werblin, 1987) y más grandes que las de pez gato ($219 \mu\text{m}^2$; Miyamoto y cols., 1992).

La resistencia de entrada, calculada de la amplitud de la corriente inducida por pulsos de voltaje hiperpolarizantes de 25 ms, aplicados desde un potencial de mantención de -70 mV, dió un promedio de $4.7 \pm 1.16 \text{ G}\Omega$ (promedio \pm D.S.), en un total de 15 neuronas analizadas.

El potencial de reposo de las neuronas fue estimado en condiciones de corriente controlada, mientras la célula se mantenía con una corriente de 0 pA. El potencial medido en 14 neuronas fluctuó entre -30 a -80 mV con una media de $-66 \text{ mV} \pm 14 \text{ mV}$ (promedio \pm D.S.).

3. Actividad eléctrica espontánea en neuronas olfatorias aisladas.

Una característica de muchas neuronas, incluyendo las células olfatorias, es su actividad eléctrica espontánea. El reconocimiento de esta actividad en neuronas olfatorias del sapo se realizó mediante la técnica de *patch clamp* en la modalidad de célula adherida a la pipeta de registro. Esta técnica, que es no invasiva, permite registrar en células intactas, corrientes de acción asociadas a los potenciales de acción, una vez que se ha establecido el sello entre la membrana y la pipeta. No fueron necesarios sellos de alta resistencia para observar las corrientes de acción espontáneas, aunque si éstos eran superiores a $1 \text{ G}\Omega$, los registros resultaron más estables y perdurables en el tiempo ($>$

30 min). Todos los registros fueron obtenidos con el potencial de la pipeta mantenido en 0 mV. En 241 de un total de 281 neuronas olfatorias así analizadas (86%) se observó actividad eléctrica espontánea. El patrón más común de esta actividad fue la descarga al azar de corrientes de acción en forma de espigas. La particularidad más sobresaliente de estas corrientes de acción fue su forma bifásica, la que es característica de registros extracelulares y resulta de las fases de despolarización y repolarización de un potencial de acción. Frecuentemente, la apertura de un canal en el trozo de membrana encerrado por la pipeta, estuvo asociada a la generación de un potencial de acción (figura 8). Las amplitudes de las corrientes de acción asociadas a estos potenciales fueron de mayor magnitud que las registradas en ausencia de canales iónicos o cuando éstos permanecían cerrados (ver figura 8, segundo trazo al final).

La frecuencia de descarga de potenciales de acción espontáneos varió de célula a célula dentro de un intervalo de 0 a 150 potenciales de acción por minuto, con un promedio de 37 ± 12 PA/min (0.6 ± 0.2 Hz, promedio \pm D.S.). Esta frecuencia aumentó cuando el potencial en la pipeta se cambió a +40 mV, debido a la despolarización que sufre la neurona olfatoria producto de la corriente inyectada al aplicar este voltaje hiperpolarizante (Figura 9).

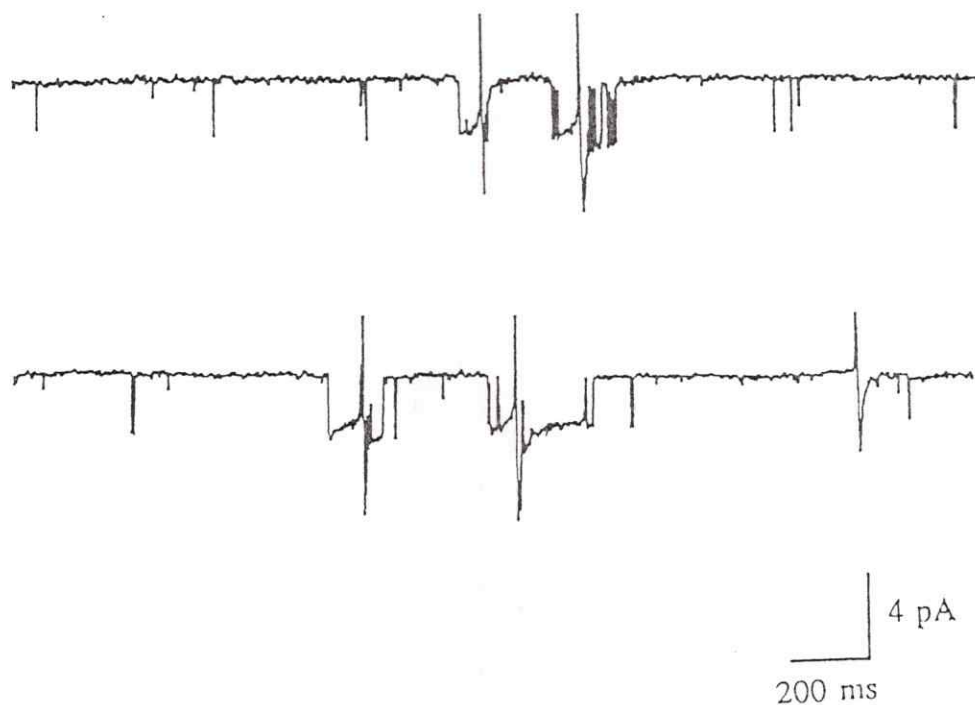


Figura 8. Registro de potenciales de acción espontáneos. Los potenciales se registraron como corrientes de acción, usando la técnica del *patch clamp* en la modalidad de célula adherida a la pipeta. Se muestra la forma bifásica de las corrientes de acción. También se aprecia que cuando se abre un canal que permite un flujo de corriente hacia la célula, se genera un potencial de acción.

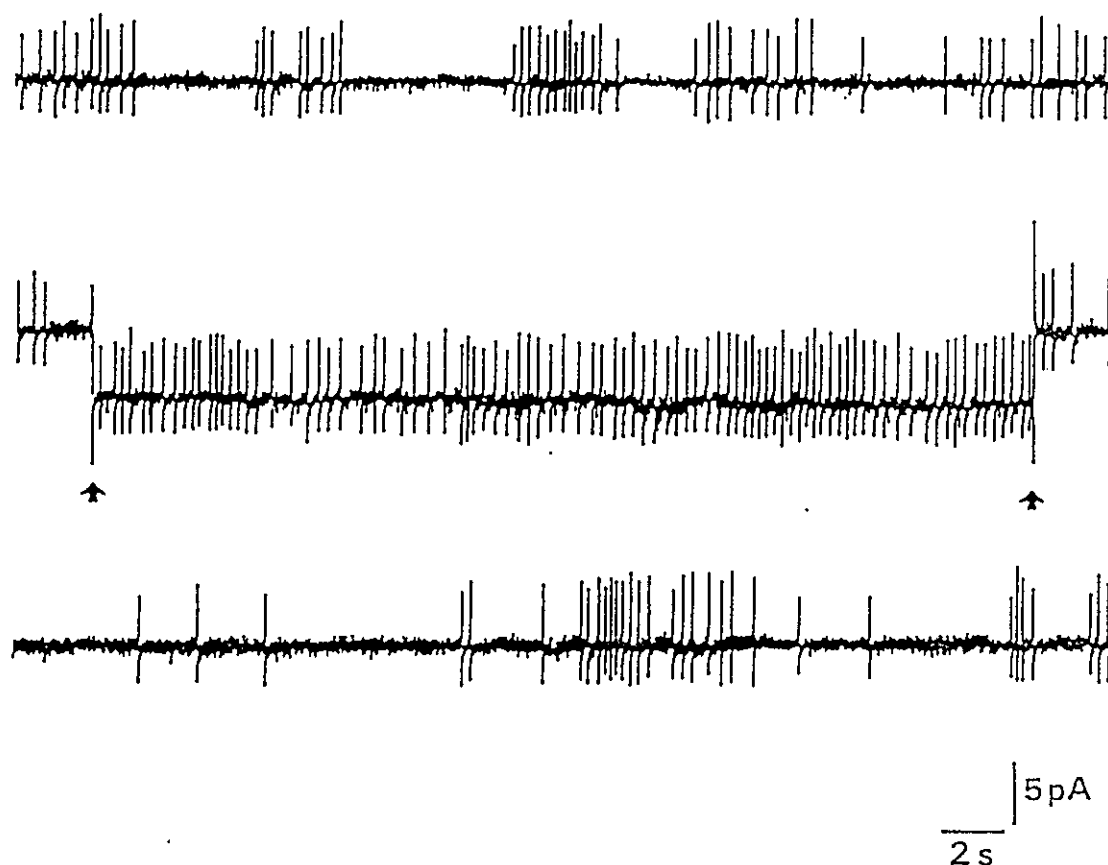


Figura 9. Aumento de la actividad espontánea de potenciales de acción inducida por pulsos de voltaje. La actividad eléctrica se registró en la modalidad de célula adherida a la pipeta de registro. En el trazo superior se muestra la actividad espontánea de potenciales de acción. El potencial de la pipeta fue 0 mV. Esta actividad aumentó desde 128 PA/min (2.1 Hz) a 253 PA/min (4.2 Hz), al aplicar un pulso de voltaje de +40 mV en la pipeta (trazo central). El período de tiempo en que se aplicó el pulso está indicado por las flechas. La frecuencia volvió al nivel basal (154 PA/min; 2.5 Hz) después de aplicado el estímulo eléctrico (trazo inferior).

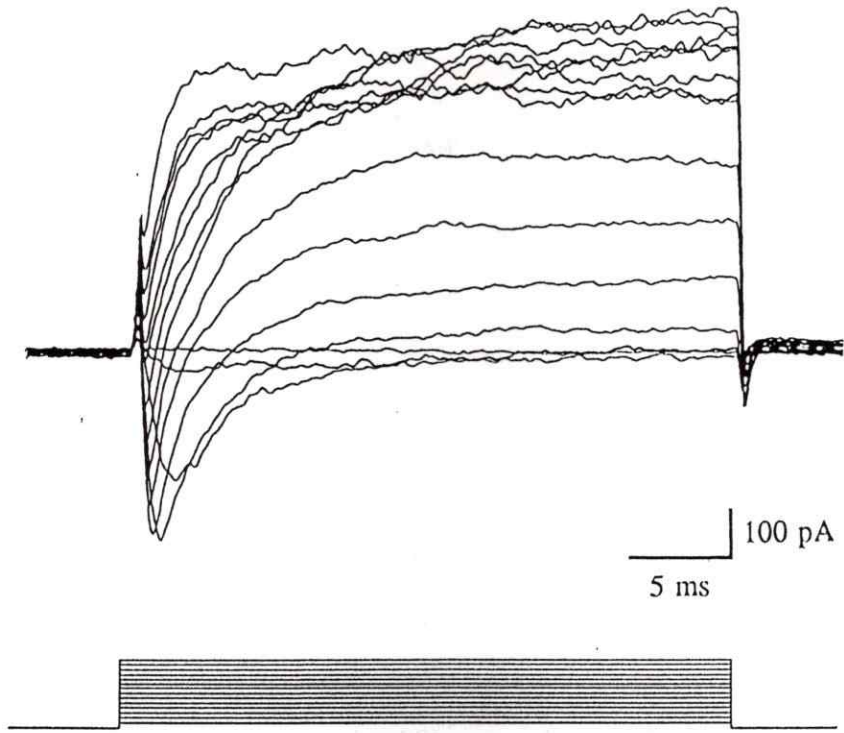
4. Corrientes dependientes de voltaje en neuronas olfatorias.

Cuando los odorantes activan un mecanismo de quimiotransducción en neuronas olfatorias, el efecto que se observa son cambios en la actividad eléctrica de la célula, producto de la activación de corrientes dependientes de potencial. Entonces, para entender apropiadamente la fisiología de la célula se requiere obligadamente conocer las corrientes dependientes de potencial presentes en la membrana de las neuronas olfatorias. En el sapo *C. caudiverbera* esto se realizó en condiciones de voltaje controlado, aplicando una serie de pulsos de voltaje despolarizantes a partir de un V_{mant} de -70 mV. Las neuronas respondieron a este protocolo con la generación de una corriente de entrada transitoria que se inactiva en milisegundos, seguida en el tiempo por una gran corriente de salida sostenida que se desarrolla lentamente (figura 10A). La curva I-V construida con los picos de la corriente de entrada, muestra que ésta comienza a manifestarse a los -50 mV alcanza una amplitud máxima a los -30 mV y decae a voltajes más positivos (círculos llenos, figura 10B). En tanto, la relación I-V de la corriente de salida construida con los valores de amplitud tomados al término de cada pulso de voltaje, muestra que esta corriente comienza a desarrollarse a -30 mV, alcanza un máximo a +40 mV y decae a potenciales más positivos para nuevamente volver a subir (círculos abiertos, figura 10B). Esta curva I-V muestra la clásica forma N que presenta una corriente de salida compuesta por una corriente de K^+ tipo rectificador tardío y otra de K^+ activada por Ca^{2+} (Hille, 1994). Esta evidencia fue confirmada realizando otros estudios con sustitución de iones, donde se demostró que la corriente

de entrada presentaba dos componentes: una corriente de entrada transitoria portada por Na^+ y una corriente de entrada mantenida portada por Ca^{2+} (Morales y Ugarte, 1989; Delgado y Labarca, 1993).

El protocolo de pulsos de voltaje empleado en este estudio, el cual se muestra en la parte inferior de los registros, se utilizó en forma rutinaria al inicio de cada experimento para verificar que el potencial de la membrana de la neurona estaba controlado apropiadamente.

A



B

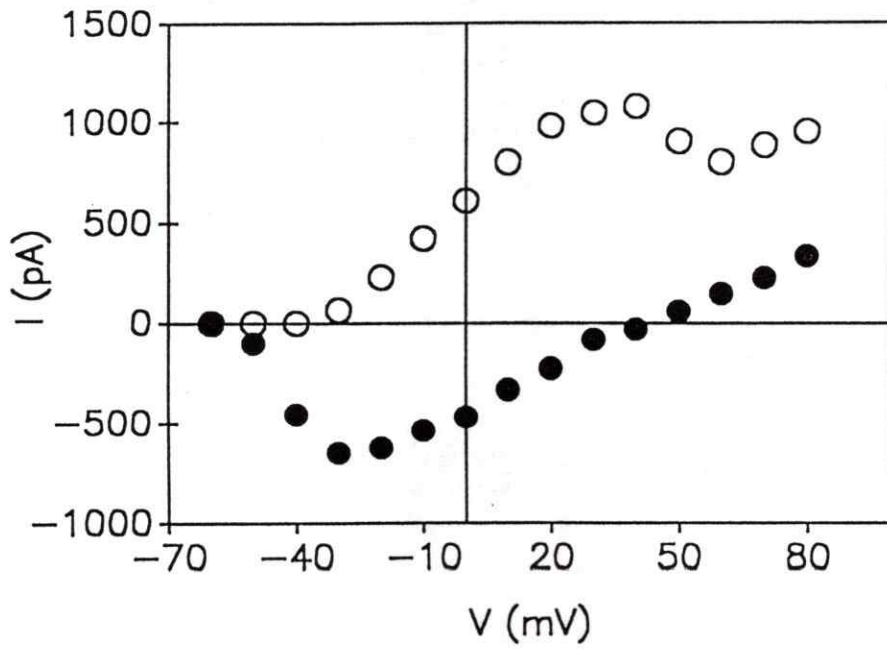


Figura 10

Figura 10. Corrientes dependientes de voltaje presentes en las neuronas olfatorias. En **A** se muestran los registros de las corrientes inducidas por el protocolo de pulsos de voltaje que se indica bajo los registros. Estas corrientes fueron obtenidas en condiciones iónicas normales. La neurona fue bañada en Ringer normal y la pipeta de registro fue llenada con solución interna (tabla 3). El V_{mant} fue de -70 mV. En **B** se ilustra la relación I-V de las corrientes de entrada (círculos llenos) y de las corrientes de salida (círculos abiertos). Los datos experimentales para la corriente de entrada fueron obtenidos de los picos de las corrientes, en tanto, para la corriente de salida se obtuvieron de las amplitudes medidas al término de cada pulso de voltaje.

II. RESPUESTA EXCITATORIA INDUCIDA POR ODORANTES QUE ACTIVAN LA ADENILIL CICLASA.

1. Incremento en la actividad eléctrica inducida por odorantes de la mezcla I.

La etapa inicial del estudio de la quimiotransducción olfativa en esta Tesis consistió en investigar el comportamiento de las neuronas olfatorias aisladas de sapo frente a un estímulo químico. Para ésto, las células olfatorias fueron estimuladas con pulsos localizados de odorantes de la mezcla I. De 75 neuronas olfatorias estimuladas con esta mezcla, 26 (35%) respondieron de una forma dosis-dependiente con un incremento transitorio en la frecuencia de potenciales de acción después de una latencia de 100 a 700 ms. El trazo superior de la figura 11 ilustra un ejemplo representativo de este efecto. El intervalo de concentración en el cual las células respondieron a la mezcla I fue del orden de una unidad logarítmica. Las neuronas también exhibieron una variedad de patrones de disparos de potenciales de acción al ser estimuladas con pulsos idénticos de odorantes (Morales y cols, manuscrito en preparación).

2. Corriente de transducción inducida por odorantes excitatorios.

Con el propósito de estudiar la corriente responsable de inducir el aumento de la frecuencia de potenciales de acción en neuronas expuestas a la mezcla I, se establecieron primero las condiciones para registrar la actividad eléctrica en condiciones de célula adherida a la pipeta y luego, las corrientes totales en la modalidad de célula completa bajo potencial controlado. Las 8 neuronas olfatorias que respondieron con un aumento en la descarga de potenciales de acción presentaron una corriente de entrada despolarizante. La figura 11 muestra una neurona que es capaz de responder a un mismo pulso de la mezcla I con un aumento en la frecuencia de potenciales de acción y con una corriente de entrada despolarizante. La activación de la corriente de entrada inducida por odorantes fue precedida por una latencia que dependió inversamente de la intensidad del estímulo y de su duración. En esta Tesis se encontraron tiempos de latencia entre 300 ms y 900 ms (478 ± 243 ms, promedio \pm D.S.) para pulsos prolongados (> 2 s) y superiores a 1 s (1.9 ± 635 ms, promedio \pm D.S.) para estímulos cortos (< 100 ms), valores levemente superiores al rango encontrado en salamandra; 180 a 280 ms y 425 a 570 ms, respectivamente (Firestein y cols., 1990). Estos valores son del mismo orden de magnitud de aquéllos obtenidos en el estudio de la actividad eléctrica (comparar registros de la figura 11). La latencia de centenares de milisegundos que precede a la respuesta inducida por los odorantes de la mezcla I es consistente con la idea que en la transducción de los odorantes excitatorios participa un mensajero secundario. Otra importante característica de la corriente de

Odorantes

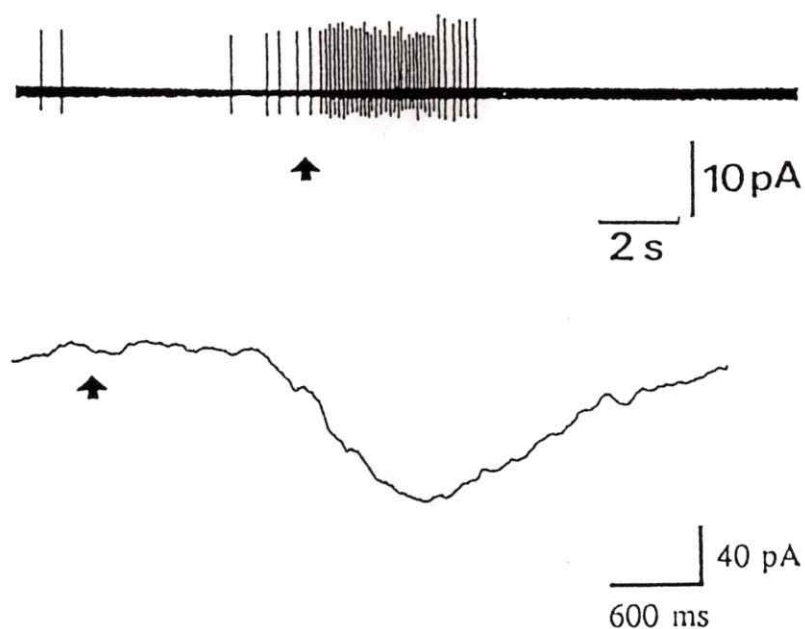


Figura 11. Actividad eléctrica y corriente de entrada activadas por odorantes de la mezcla I. La aplicación de $20 \mu\text{M}$ de la mezcla I con un pulso de 40 ms (flecha) sobre una célula mantenida en condiciones de célula adherida a la pipeta, aumentó la frecuencia de potenciales de acción (**trazo superior**). El mismo estímulo aplicado a la célula después de establecer a la condición de registro de célula completa con un V_{mant} de -70 mV , gatilla una corriente de entrada de 82 pA que demoró 1 s en manifestarse (**trazo inferior**). La corriente vuelve al nivel basal con una constante de tiempo de 1 s.

entrada gatillada por olor fue su amplitud, la cual también dependió de la intensidad y de la duración del estímulo. Su relajación exponencial, en tanto, guardó relación con la magnitud de la respuesta generada, cuanto mayor es la amplitud de la respuesta mayor

es la constante de relajación.

3. Potencial de receptor excitatorio inducido por odorantes de la mezcla I.

Sobre la base de las evidencias obtenidas, es posible suponer que la corriente de entrada inducida por los odorantes de la mezcla I, gatilla la generación de un potencial de receptor despolarizante. Esto se investigó registrando la corriente de entrada inducida por los odorantes de la mezcla I en condiciones de voltaje controlado y el cambio de potencial de membrana inducido por esta mezcla de odorantes, en condiciones de corriente controlada. Todas las neuronas que presentaron la corriente de entrada sensible a odorantes ($n=8$), respondieron con la generación de un potencial de receptor excitatorio al ser expuesta a odorantes de la mezcla I. Un ejemplo representativo de este estudio se muestra en los trazos superiores de la figura 19.

Los resultados presentado hasta aquí, demuestran que el aumento en la actividad eléctrica inducida por odorantes es generado por la activación de una corriente de entrada que despolariza la célula.

4. Relación corriente-voltaje de la corriente inducida por odorantes excitatorios.

El estudio de la relación I-V de la corriente de transducción inducida por la mezcla I se realizó mediante la técnica del *patch clamp* en la modalidad de célula completa bajo potencial controlado. Este consistió en obtener gráficos de las corrientes inducidas por odorantes en función del potencial impuesto a través de la membrana de las neuronas olfatorias. El análisis de las relaciones I-V mostraron, por una parte, que la corriente inducida por la mezcla I es lineal en el intervalo fisiológico de potenciales de membrana y, por otra, que ésta invierte su signo en un potencial próximo a 0 mV (figura 12), sugiriendo que los odorantes del tipo I activan una conductancia inespecífica portada principalmente por Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} (Zufall y cols., 1994).

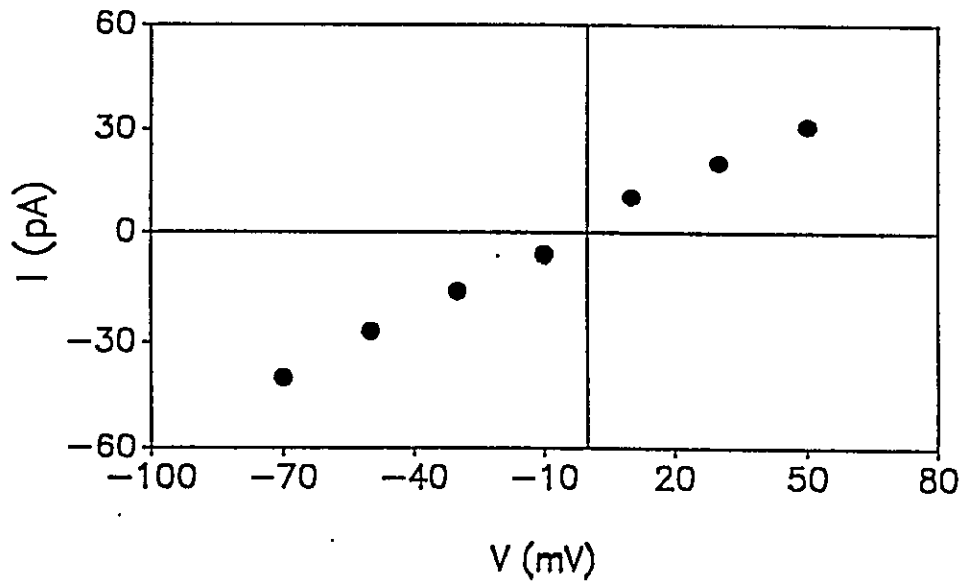
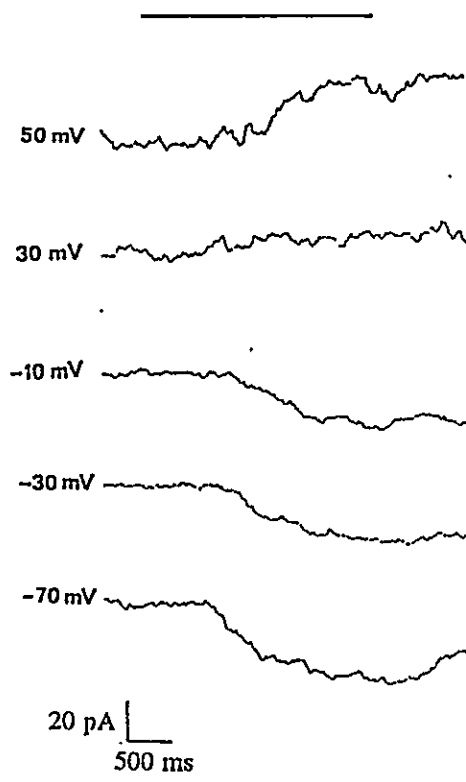


Figura 12

Figura 12. Relación I-V de la corriente activada por odorantes excitatorios. A. Trazos de corriente obtenidos al aplicar $1 \mu\text{M}$ de la mezcla I mientras la célula era mantenida a los voltajes especificados a la izquierda de los registros. La mezcla de odorantes fue aplicada durante el período indicado por la barra. En este experimento el KCl de la solución interna del electrodo de registro fue reemplazado por CsCl para eliminar las corrientes de K^+ . **B.** Gráfico I-V construido a partir de las amplitudes máximas de las corrientes mostradas en A. Se aprecia que la relación corriente-voltaje es lineal en el intervalo fisiológico de potencial de membrana y que la corriente invierte cerca de los 0 mV.

III. RESPUESTA INHIBITORIA INDUCIDA POR ODORANTES QUE NO ACTIVAN LA CASCADA DEL AMP CICLICO.

1. Inhibición de la actividad eléctrica inducida por odorantes de la mezcla II.

Parte de las evidencias presentadas en la sección anterior demuestran claramente que los odorantes de la mezcla I aumentan la frecuencia de potenciales de acción en neuronas olfatorias aisladas del sapo *Caudiverbera caudiverbera*. El aumento es producido a través de la activación de la cascada del AMPc. Este mensajero activa por acción directa una conductancia que genera el potencial de receptor responsable del aumento en la frecuencia de potenciales de acción. Sin embargo, un importante grupo de odorantes no activa la adenilil ciclasa. Con el objeto de investigar el mecanismo de quimiotransducción para estos odorantes, las neuronas olfatorias aisladas fueron estimuladas con odorantes de la mezcla II.

Primeramente, se estudió el efecto de estos odorantes sobre la actividad eléctrica de las neuronas olfatorias aisladas en condiciones de célula adherida a la pipeta de registro. A diferencia de lo observado con odorantes de la mezcla I, las neuronas olfatorias expuestas a la mezcla II respondieron con una inhibición en la descarga espontánea de potenciales de acción que duró varios segundos (figura 13), después de la cual las neuronas recuperaron su actividad eléctrica espontánea regular. Para observar este efecto se escogieron células quimiosensoriales que presentaran una elevada actividad

basal de potenciales de acción. La inhibición inducida por los odorantes del tipo II se observó en 15 de un total de 42 (36%) neuronas analizadas, muchas de las cuales fueron incapaces de responder a la mezcla I (figura 13). Ninguna célula respondió a estos odorantes con un efecto contrario al de la inhibición. El alto porcentaje de neuronas que respondieron con una inhibición en la actividad eléctrica sugiere fuertemente que el fenómeno de la inhibición es importante en la percepción olfativa de los anfibios.

2. Respuestas inhibitoria y excitatoria en una misma neurona olfatoria.

También se investigó la posibilidad que la misma neurona que respondió con una inhibición de la actividad eléctrica a la mezcla II pudiese ser excitada con odorantes de la mezcla I. De un total de 28 neuronas olfatorias estimuladas con odorantes del tipo II, en 10 (36%) se observó una inhibición en la descarga de potenciales de acción con las mismas características mostradas en la sección anterior; en tanto las 18 restantes no respondieron a esta mezcla. Las 10 neuronas olfatorias inhibidas con la mezcla II también fueron expuestas a la mezcla I. En 5 (50%) de estas células se observó un aumento en la frecuencia de potenciales de acción (figura 14). Las otras 5 neuronas no mostraron este efecto y sólo respondieron a la mezcla II (figura 13). Por otro lado, de las 18 neuronas que fueron incapaces de responder a la mezcla II, 9 (50%) desarrollaron un aumento en la descarga de potenciales de acción al ser estimuladas con odorantes de la mezcla I. Es importante señalar que todas las respuestas inducidas por los odorantes

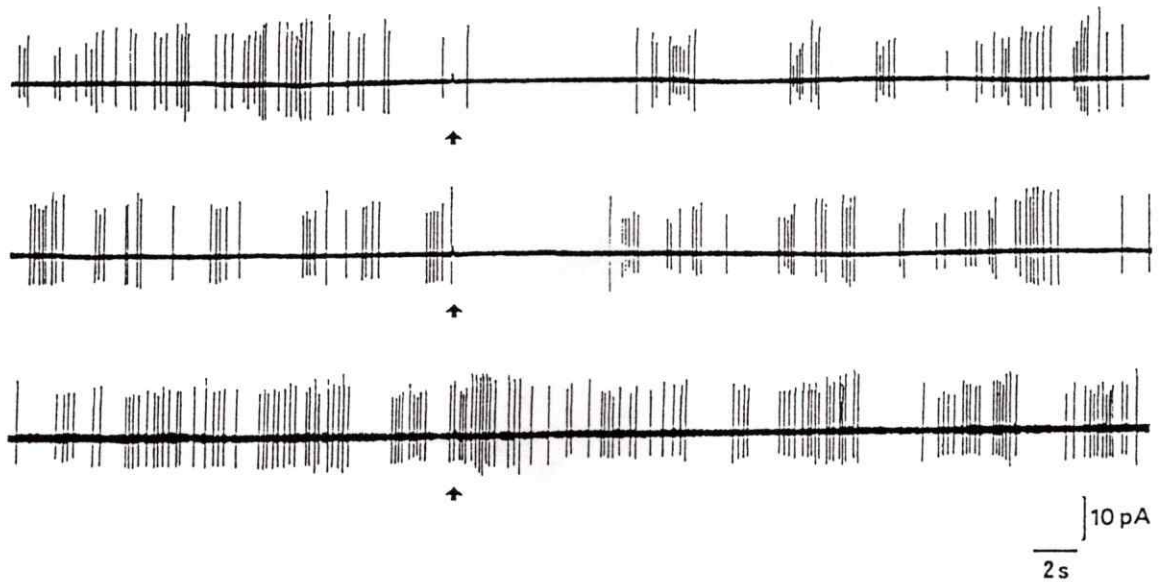


Figura 13. Inhibición de la actividad eléctrica inducida por la mezcla II en neuronas olfatorias aisladas. La actividad eléctrica fue registrada en la modalidad de célula adherida a la pipeta. La aplicación de $100 \mu\text{M}$ de la mezcla II en la región ciliar de la neurona olfatoria, mediante un pulso de 40 ms (flecha) indujo una inhibición en la descarga de potenciales de acción espontáneos durante 10 s (**trazo superior**). Este efecto se repite al aplicar un segundo estímulo similar al anterior (**trazo central**). La subsecuente estimulación de esta neurona con la mezcla I no afectó su actividad eléctrica espontánea (**trazo inferior**).

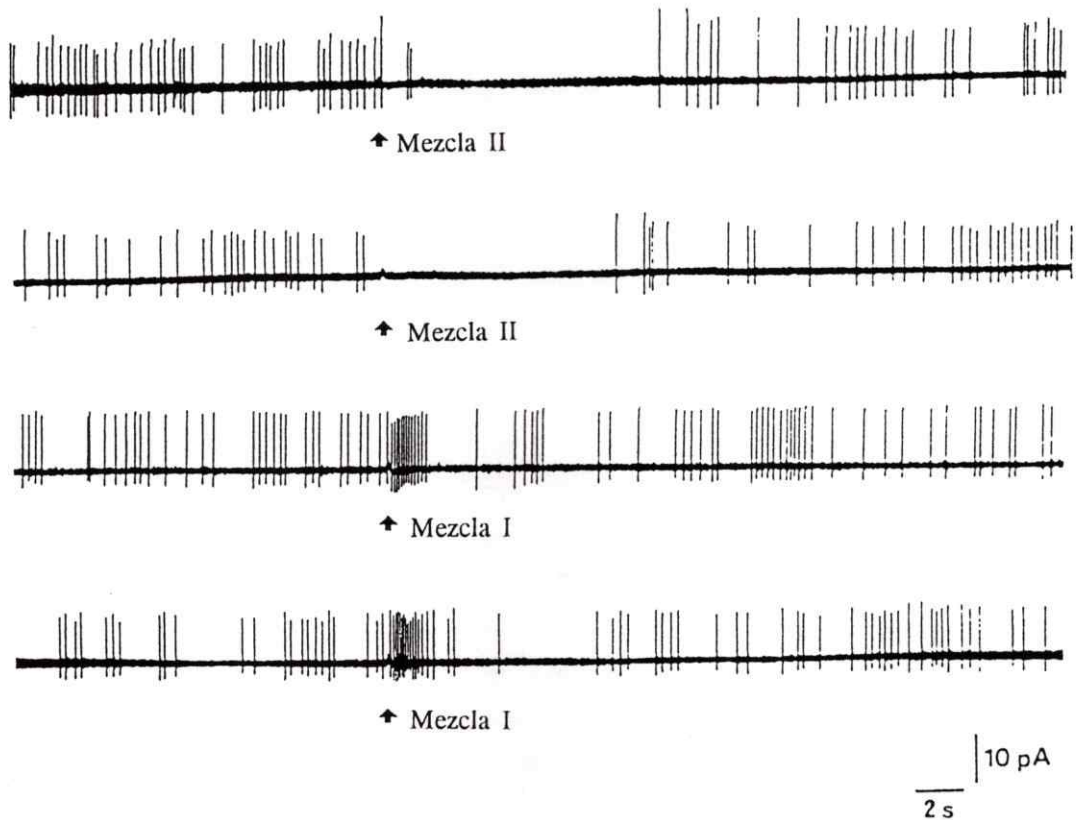


Figura 14. Respuestas inhibitorias y excitatorias inducidas por odorantes en una misma neurona olfatoria. La actividad eléctrica se registró en la modalidad de célula adherida a la pipeta de registro. Los dos trazos superiores muestran la inhibición de la actividad eléctrica espontánea al exponer una neurona a 100 μM de la mezcla II (flechas). Los dos trazos inferiores muestran el aumento de la frecuencia de potenciales de acción inducido por 10 μM de la mezcla I (flecha) en la misma neurona olfatoria. Las mezclas fueron aplicadas con pulsos de 40 ms.

del tipo II, fueron inhibitorias; por el contrario, todas las respuestas gatilladas por la mezcla I fueron siempre excitatorias. Así, en el epitelio olfatorio de anfibios es posible distinguir, con las mezclas de odorantes utilizadas en este estudio, al menos tres poblaciones de neuronas: una que responde solamente a la mezcla II, otra que responde solamente a la mezcla I y una tercera que responde a ambas mezclas de odorantes.

Los resultados de este estudio muestran que los odorantes de la mezcla I y de la mezcla II inducen efectos opuestos en las neuronas olfatorias del sapo chileno. Las células responden con un aumento en la descarga de potenciales de acción al ser estimuladas con odorantes de la mezcla I, en cambio responden con una inhibición al ser estimuladas con odorantes de la mezcla II. También demuestran que el 18% de la población de neuronas analizadas desarrollan ambos tipos de respuestas. Esta evidencia representa la primera demostración que una misma neurona olfatoria es capaz de responder en forma excitatoria e inhibitoria, dependiendo del estímulo a la que es expuesta. Esto sugiere que los mecanismos que operan en la transducción de ambos grupos de odorantes son diferentes y que éstos podrían coexistir en una misma célula.

3. Corriente de salida inducida por odorantes de la mezcla II en neuronas olfatorias aisladas.

Una predicción lógica que se desprende de los resultados presentados anteriormente, es que los odorantes que ejercen una inhibición de la actividad eléctrica lo hacen a través de la activación de una corriente de salida hiperpolarizante. Para registrar esta corriente fue necesario aumentar la fuerza impulsora para los iones que posiblemente estarían involucrados en el fenómeno inhibitorio (K^+ o Cl^-). Esto se realizó llevando las células desde un potencial de mantención de -70 mV a uno de 0 mV, lo que además permitió descartar una posible contaminación por la corriente excitatoria. Es importante recordar que en 0 mV las neuronas estimuladas con odorantes del tipo I fueron incapaces de generar una respuesta, debido a que el potencial de inversión de esta corriente es de 0 mV (figura 12; Firestein y Werblin, 1989; Firestein y cols., 1990). Bajo estas condiciones experimentales, las neuronas olfatorias aisladas respondieron a odorantes de la mezcla II con la generación de una corriente de salida que alcanzó rápidamente la amplitud máxima y se relajó con una constante de tiempo del orden de minutos. (trazo 3, figura 15). La corriente comenzó a manifestarse centenas de milisegundos después de aplicado el estímulo y, al igual que los odorantes excitatorios, esta latencia dependió inversamente de su intensidad y duración. El rango encontrado para esta latencia fue entre 167 ms para pulsos prolongados (2.5 s) y de 400 ms para pulsos de corta duración (500 ms). La aplicación de pulsos de Ringer sin odorantes, en las mismas condiciones experimentales en la que se observó la corriente de salida

activada por odorantes, no produjo ningún efecto, descartando la posibilidad de un artefacto (trazo 2, figura 15). Por otro lado, las neuronas que respondieron a odorantes del tipo II con una corriente de salida registrada a 0 mV fueron incapaces de generar una respuesta cuando fueron estimuladas bajo un potencial mantenido en -70 mV (trazo 1, figura 15). A este potencial de fijación los odorantes de la mezcla I inducen una corriente de entrada de varios picoamperios (figura 11; Firestein y Werblin, 1989; Firestein y cols., 1990).

La corriente de salida inducida por la mezcla II fue observada en 37 (40%) de 92 neuronas examinadas, porcentaje muy similar al obtenido en el estudio de la actividad eléctrica (36%).

Con el propósito de conocer si la respuesta inhibitoria inducida por odorantes se encuentra en otras especies de vertebrados, se realizó este estudio en neuronas olfatorias aisladas del sapo africano *Xenopus laevis*. La figura 16 muestra que estas neuronas responden a odorantes de la mezcla II con una corriente de salida similar a la desarrollada por las neuronas olfatorias de *C. caudiverbera*. Esta respuesta fue observada en 4 de 10 neuronas estimuladas en esta especie.

Los resultados presentados sugieren que la inhibición de la actividad eléctrica inducida por la mezcla II es producida por la activación de una corriente de salida. Si éste es el caso, la corriente de salida sensible a olor debería estar presente en neuronas que muestran una inhibición de la actividad eléctrica al ser expuesta a la mezcla II. La figura 17 muestra que una misma neurona olfatoria responde con una inhibición de la actividad eléctrica y con la generación de una corriente de salida frente a un estímulo

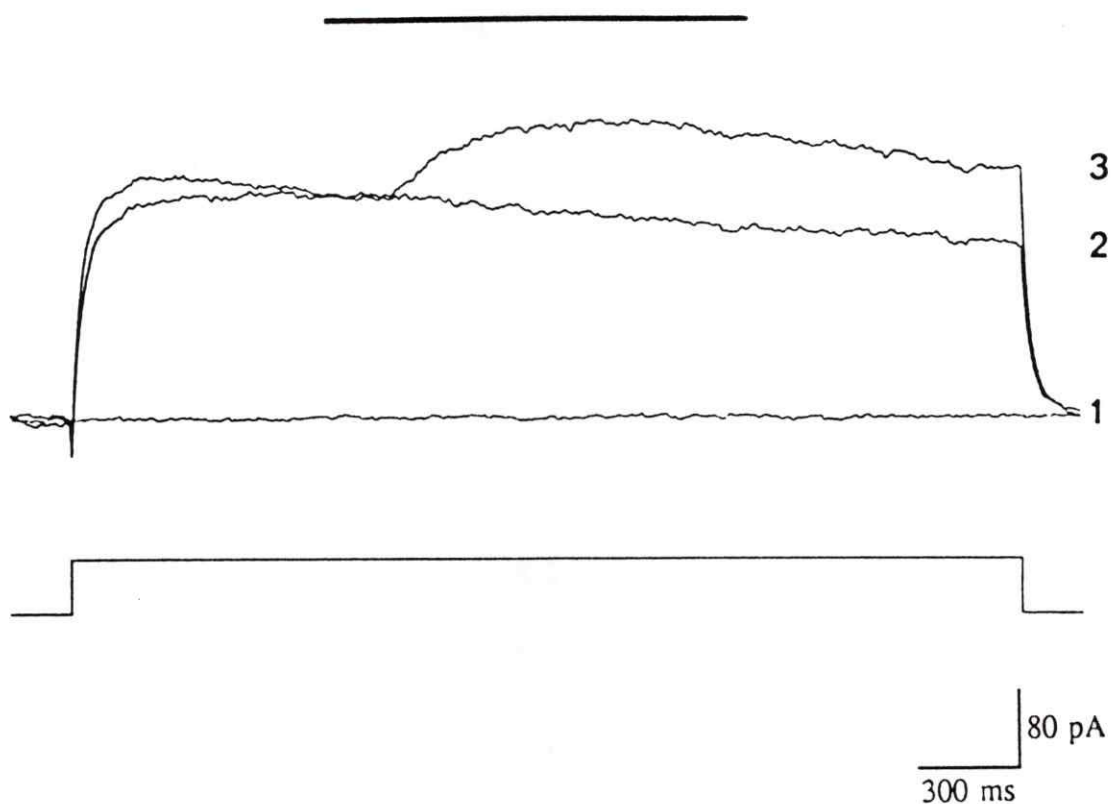


Figura 15. Corriente de salida inducida por odorantes de la mezcla II en neuronas olfatorias aisladas. Las corrientes totales se registraron en condiciones de voltaje controlado. El **trazo 1** muestra que un pulso de $10 \mu\text{M}$ de la mezcla II (barra) aplicado en la región ciliar de una neuronas olfatorias no produjo ningún efecto sobre la corriente registrada a un voltaje de mantención de -70 mV . El **trazo 2** ilustra las corrientes inducidas al cambiar el voltaje de mantención de la célula desde -70 a 0 mV . Se aprecia el desarrollo de una corriente de entrada transitoria seguida de una gran corriente de salida que se inactiva lentamente. Un pulso de Ringer sin odorantes (barra), con características similares a las empleadas en el experimento anterior, no indujo respuesta. En el **trazo 3**, se muestra que la aplicación de un pulso de $10 \mu\text{M}$ de la mezcla II (barra) bajo las mismas condiciones experimentales anteriores, activó una corriente de salida que comienza a desarrollarse 200 ms después de aplicado el estímulo.

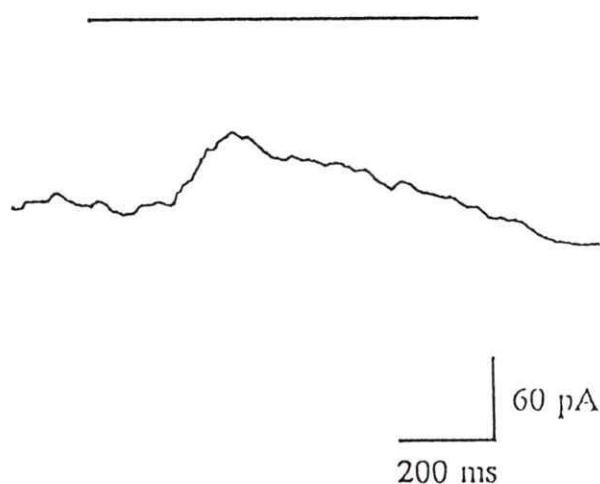


Figura 16. Corriente de salida inducida por odorantes de la mezcla II en neuronas olfatorias aisladas de *Xenopus laevis*. Las corrientes totales fueron registradas en condiciones de voltaje controlado. Se ilustra la corriente de salida inducida por $20 \mu\text{M}$ de la mezcla II en una neurona cuyo potencial fue fijado en 0 mV. Para mayor claridad sólo se muestra el trazo de corriente durante la aplicación del estímulo químico (barra).

idéntico de odorante. Observaciones similares fueron hechas en otras 3 neuronas.

Las evidencias permiten concluir que la inhibición de la actividad eléctrica inducida por los agentes odoríferos de la mezcla II es producida por la activación de una corriente de salida dependiente de odorante. Además, el retardo observado en la generación de esta respuesta indica que en la vía de transducción de esta clase de odorantes podría participar un mensajero secundario. Este mecanismo podría estar presente en otras especies de vertebrados, ya que en neuronas de *Xenopus* también fue encontrada la corriente hiperpolarizante inducida por odorantes de la mezcla II.

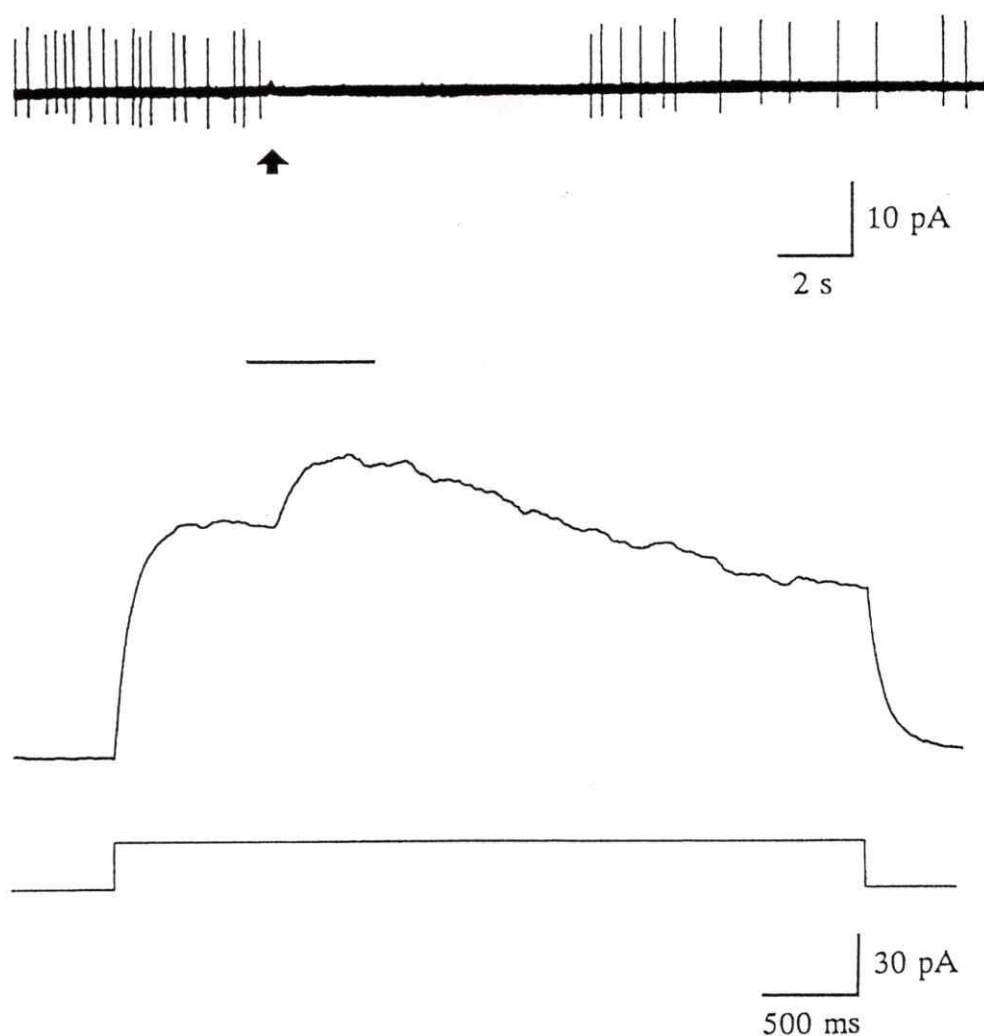


Figura 17. Inhibición de la actividad eléctrica y activación de una corriente de salida gatilladas por odorantes de la mezcla II en una misma neurona olfatoria. La actividad eléctrica se registró en la modalidad de célula adherida a la pipeta y las corrientes totales en la modalidad de voltaje controlado. En el trazo superior se muestra la inhibición en la descarga de potenciales de acción al estimular la neurona con $100 \mu\text{M}$ de la mezcla II (flecha). En el trazo inferior, se muestra la corriente dependiente de voltaje gatillada por un cambio de voltaje desde -70 a 0 mV y la corriente de salida inducida por un pulso de $10 \mu\text{M}$ de la mezcla II, 300 ms después de aplicado el odorante (barra). El pulso de voltaje es indicado bajo el registro. El voltaje de mantención de la célula fue de -70 mV.

4. Hiperpolarización y despolarización inducida por odorantes en neuronas olfatorias.

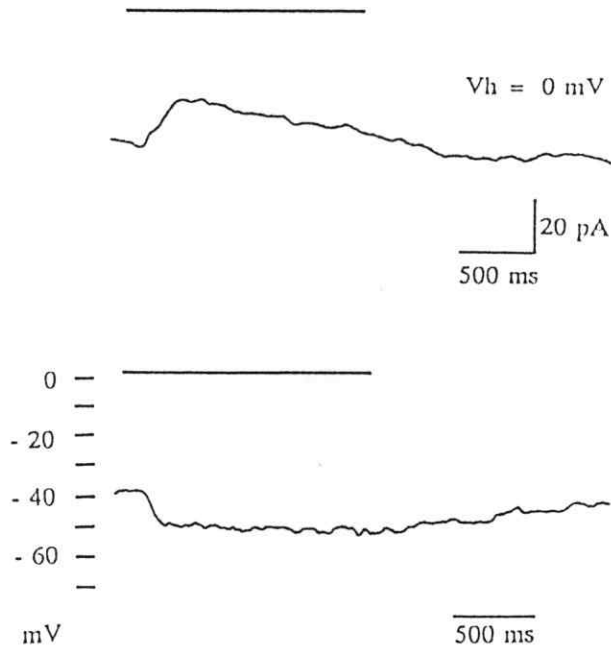
A la luz de las evidencias presentadas anteriormente, es razonable suponer que la corriente de salida inducida por odorantes inhibe la actividad eléctrica a través de la generación de un potencial de receptor hiperpolarizante. Por lo tanto, es esperable que las neuronas olfatorias que respondieron con una corriente de salida a la mezcla II también respondan con la generación de un potencial de receptor hiperpolarizante. Este supuesto fue demostrado registrando las corrientes activadas por odorantes en la condición de voltaje controlado y los cambios en el potencial de membrana inducidos por odorantes en condiciones de corriente controlada. La figura 18A muestra que las neuronas que respondieron con el desarrollo de una corriente de salida a odorantes de la mezcla II responden a este mismo estímulo con la generación de un potencial de receptor hiperpolarizante. Por otro lado, la demora observada en la generación del potencial de receptor hiperpolarizante fue similar a la latencia que muestra la activación de la corriente de salida (figura 18A). Respuestas similares a las mostradas en la figura 18A se observaron en otras 10 neuronas olfatorias. Estos resultados demuestran que la respuesta inhibitoria inducida por odorantes del tipo II en neuronas olfatorias es causada por la activación de una corriente de salida dependiente de odorante que hiperpolariza la neurona olfatoria. Aunque las células quimiosensoriales fueron estimuladas con una mezcla de odorantes, ellas también respondieron a componentes individuales de dicha mezcla con una corriente de características similares a las ya descritas. La figura 18B

muestra la hiperpolarización del potencial de membrana inducida por 50 μM del odorante ácido isovalérico, uno de los componentes de la mezcla II.

El estudio del efecto de odorantes sobre la actividad eléctrica demostró que una misma neurona puede responder excitatoria o inhibitoriamente, dependiendo del estímulo químico a la que es expuesta. Para confirmar estos resultados, se investigó si las neuronas que desarrollan una corriente de entrada y un potencial de receptor despolarizante al ser estimuladas con olores del tipo I, pueden responder además a los odorantes del tipo II con la generación de una corriente de salida y un potencial de receptor hiperpolarizante. La figura 19 ilustra un ejemplo representativo de este estudio. Se puede apreciar que la célula fijada a -70 mV respondió con una corriente de entrada al ser estimulada con la mezcla I (trazo i). Un pulso similar aplicado en condiciones de corriente controlada con un I_{mant} de 0 mV generó un potencial de receptor despolarizante (trazo ii). La misma célula respondió a la mezcla II desarrollando una corriente de salida registrada a un V_{mant} de 0 mV y un potencial de receptor hiperpolarizante registrado a una I_{mant} de 0 pA (trazos iii y iv). Estos resultados apoyan la idea que una neurona olfatoria puede poseer más de un mecanismo de quimiotransducción.

Los resultados presentados permiten concluir que los odorantes que incrementan la descarga de potenciales de acción actúan induciendo una corriente de entrada despolarizante, en cambio aquellos que inhiben la descarga de potenciales lo hacen por la activación de una corriente de salida hiperpolarizante. También sugieren que el mecanismo de transducción para odorantes inhibitorios es diferente del mecanismo que opera para odorantes excitatorios.

A



B

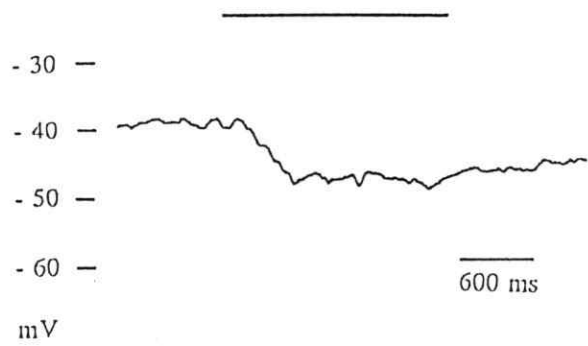


Figura 18

Figura 18. Corriente de salida e hiperpolarización inducidas por la mezcla II en una misma neurona olfatoria. La corriente fue registrada en condiciones de voltaje controlado con un V_{mant} de 0 mV y el potencial de membrana en condiciones de corriente controlada, con una I_{mant} de 0 pA. **A.** En el **trazo superior** se muestra la corriente de salida gatillada por un pulso de 40 μM de la mezcla II (barra). El **trazo inferior** ilustra la hiperpolarización inducida por un pulso idéntico al anterior. **B.** Hiperpolarización inducida por un pulso de 50 μM del odorante ácido isovalérico, un componente de la mezcla II. Sólo se representan las fracciones de los registros correspondiente al período de la estimulación química.

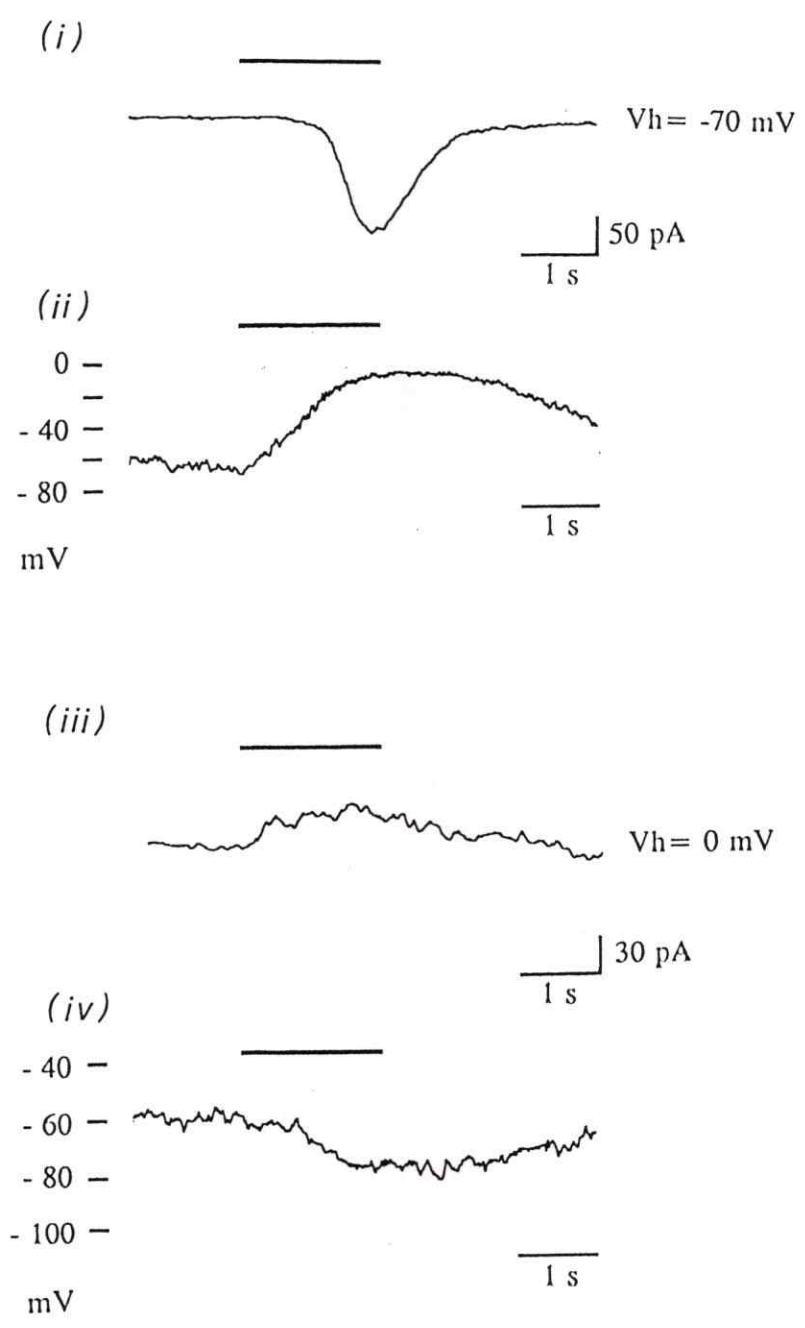


Figura 19

Figura 19. Efecto diferencial de las mezclas I y II sobre corrientes totales y potencial de membrana en una misma neurona olfatoria. Un pulso de $40 \mu\text{M}$ de la mezcla I aplicado a una neurona olfatoria mantenida a un voltaje de -70 mV gatilló una corriente de entrada que alcanza un máximo y se relaja con una constante de tiempo de centenas de milisegundos (i). Cuando un estímulo idéntico fue aplicado a la misma neurona, pero en condiciones de corriente controlada ($I_{\text{mant}} = 0 \text{ pA}$), esta respondió con una despolarización que llegó a 0 mV , para luego volver al nivel basal (ii). Un pulso de $40 \mu\text{M}$ de la mezcla II aplicado a la neurona mientras su voltaje se mantenía en 0 mV , indujo una corriente de salida que luego de alcanzar el máximo se relajó con una constante de tiempo del orden de segundos (iii). El mismo estímulo de la mezcla II aplicado en condiciones de corriente controlada ($I_{\text{mant}} = 0 \text{ pA}$), indujo una hiperpolarización de 20 mV (iv).

5. Caracterización de la corriente de salida inducida por odorantes de la mezcla II.

La caracterización de la corriente de salida inducida por odorantes se realizó haciendo estudios de: dosis-dependencia, relación corriente-voltaje, selectividad iónica y farmacología.

5.1. Relación dosis-respuesta de la corriente de salida inducida por odorantes.

Con el propósito de conocer las características de la corriente de salida dependiente de olor, se examinó la dependencia de la concentración de la mezcla II sobre la conductancia activada por odorantes. Se encontró que las neuronas olfatorias responden de una manera dosis-dependiente a los odorantes de la mezcla II, de la forma que se ilustra en la figura 20. La figura 20A muestra que el incremento en la concentración de odorantes a nivel de la célula aumenta la magnitud de la respuesta inducida por odorantes. Al graficar las amplitudes máximas de la respuesta en función de la concentración de odorantes, se puede apreciar que las células olfatorias responden en un intervalo estrecho de concentración, cubriendo aproximadamente una unidad logarítmica. La corriente comienza a manifestarse a una concentración alrededor de los $10 \mu\text{M}$ y alcanza un nivel de saturación a los $100 \mu\text{M}$ (figura 20B y 20C), intervalo que es semejante al observado para odorantes excitatorios en la forma de actividad eléctrica y de corrientes totales (Firestein y Werblin 1989; Firestein y cols., 1990; Morales y cols., manuscrito en preparación). Además, la figura 20B muestra que la curva dosis-

respuesta tiene una forma sigmoídea similar a la presentada por los odorantes excitatorios (Firestein y Werblin, 1987; Firestein y cols., 1990). El valor del coeficiente de Hill (n) que se obtuvo del mejor ajuste de los datos experimentales, realizado empleando la función $I = I_{\max} / (1 + (K_{0.5}/[O])^n)$, fue de 2.7, sugiriendo que algunos de los pasos en la cascada de transducción de estos odorantes son cooperativos. Las curvas dosis-respuesta obtenidas en otras 5 neuronas fueron similares a la mostrada en la figura 20B. Los resultados son presentados en el gráfico de Hill que se muestra en la figura 20C; este se confeccionó graficando el $\log(I/I_{\max} - I)$ en función de $[O]$, donde I_{\max} es la corriente de saturación y $[O]$ la concentración de odorante. El valor del coeficiente de Hill obtenido de la pendiente de la curva que mejor ajusta los datos experimentales, fue de 2.1 ± 0.2 (promedio \pm D.S.; $n=6$), mostrando nuevamente el efecto cooperativo de esta respuesta.

Por otro lado, se encontró que la concentración mínima de odorantes para inducir una respuesta con esta clase de odorantes fue de $3 \mu\text{M}$, levemente superior a la observada para los odorantes excitatorios (Firestein y Werblin, 1989; Firestein y cols., 1990; Morales y cols., manuscrito en preparación). Y al igual que éstos, las neuronas olfatorias son capaces de responder a la exposición mantenida de odorantes del tipo II con concentraciones submicromolares. La perfusión de neuronas olfatorias con concentraciones nanomolares de componentes individuales de la mezcla II, inhibieron la actividad eléctrica de las células (Morales y cols., 1990; Morales y cols., manuscrito en preparación).

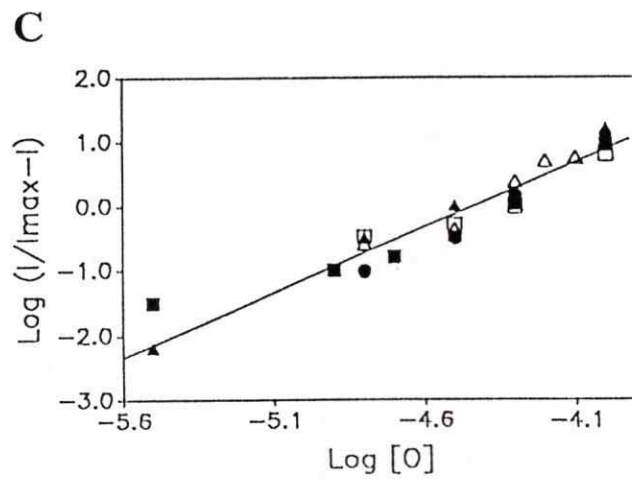
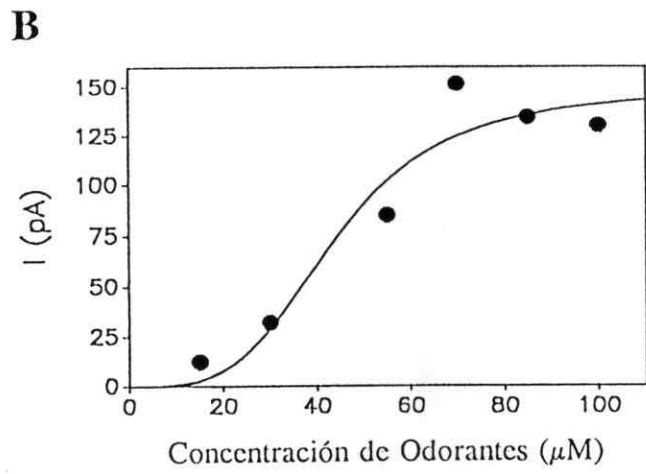
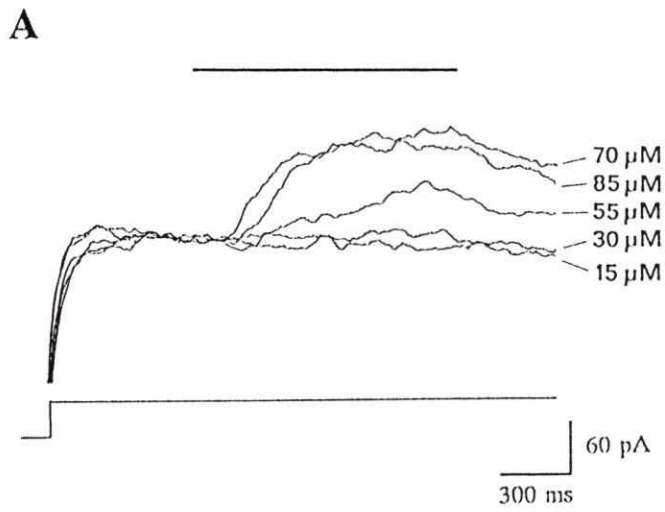


Figura 20

Figura 20. Dosis-respuesta de la corriente de salida inducida por la mezcla II. **A.** Corrientes de salida inducidas por las concentraciones de la mezcla II, especificadas a la derecha de los registros. La mezcla fue aplicada 500 ms después de cambiar el potencial de membrana de la neurona desde -70 mV a 0 mV (barra). El pulso de voltaje se indica bajo los registros. **B.** Gráfico de la corriente inhibitoria en función de la concentración de odorantes. La ordenada representa la amplitud máxima de la corriente inducida por cada concentración de odorantes de la mezcla II. La línea sólida corresponde al mejor ajuste de los datos experimentales obtenido con la función $I = I_{\max} / [1 + (K_{0.5}[O])^n]$, donde I_{\max} es la corriente de saturación, $[O]$ es la concentración de odorantes, $K_{0.5}$ es la concentración necesaria para inducir la mitad de la corriente máxima y n es el coeficiente de Hill. En este caso, $K_{0.5} = 45 \mu\text{M}$, $I_{\max} = 159 \text{ pA}$, y $n = 2.7$. **C.** Gráfico de Hill de la corriente de salida dependiente de odorante, confeccionado con los datos experimentales de 5 neuronas olfatorias. Los datos son expresados como $\text{Log } I / (I_{\max} - I)$ en función del $\text{log } [O]$. I es la amplitud de la corriente de salida a cada concentración. I_{\max} fue estimada de la amplitud de la corriente inducida por una concentración saturante de la mezcla II. El $K_{0.5}$ promedio es de $49 \pm 4.7 \mu\text{M}$ (promedio \pm D.S.) y n es de 2.1 ± 0.2 (promedio \pm D.S.).

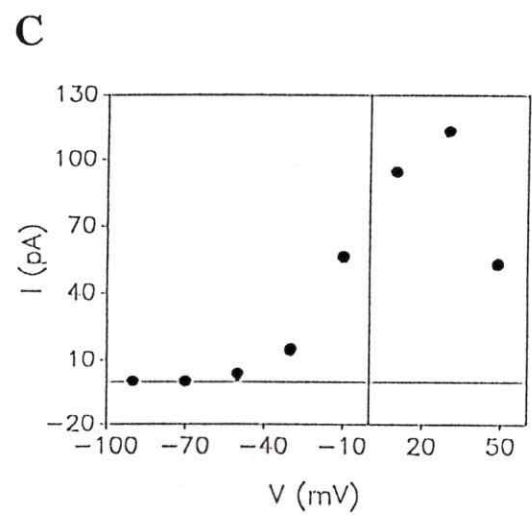
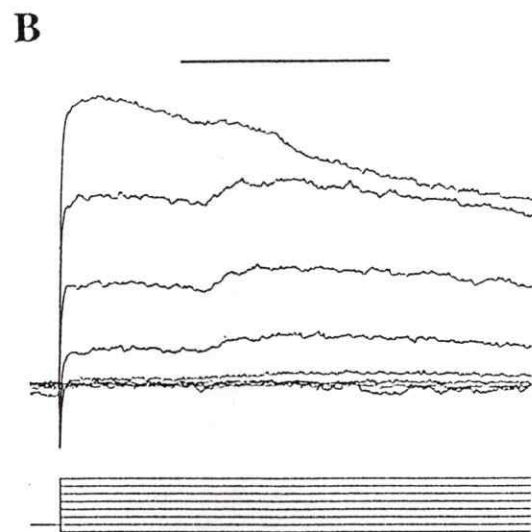
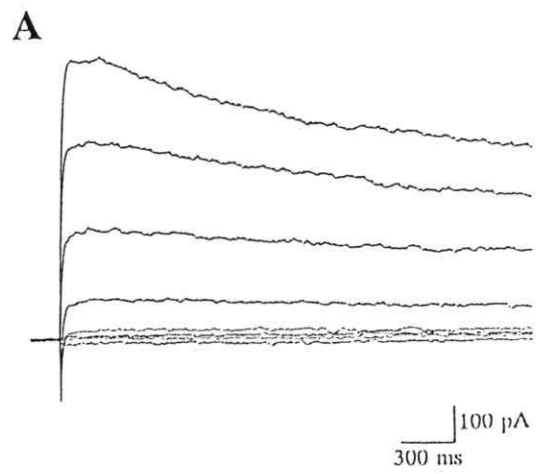


Figura 21

5.2. Relación corriente-voltaje de la corriente inducida por odorantes de la mezcla

II.

La relación corriente-voltaje para la corriente de salida inducida por odorantes se estudió en 5 neuronas olfatorias. En la figura 21 se ilustra un ejemplo representativo de este estudio. En la figura 21A se muestran las corrientes dependientes de potencial de una neurona que es sometida al protocolo de pulsos de voltaje que se indica bajo los registros, en la ausencia de odorantes. En la figura 21B se presentan las corrientes registradas empleando el mismo protocolo de pulsos de voltajes, pero esta vez la neurona fue estimulada durante cada pulso de voltaje con $30 \mu\text{M}$ de la mezcla II durante el período indicado por la barra. La mezcla de odorantes gatilló una corriente de salida que decayó lentamente y cuya amplitud dependió del potencial al cual la neurona fue mantenida. La relación I-V de esta corriente, a diferencia de lo observado para las corrientes excitatorias, no fue óhmica en el rango fisiológico de potencial de membrana y se encuentra claramente desplazada a la izquierda con respecto a la curva I-V generada con las corrientes inducidas por la mezcla I (figura 21C). En todos los casos analizados ($n=5$) se observó que la forma de las curvas I-V de las corrientes de salida inducidas por la mezcla II es semejante a la que presenta una conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} (Hille, 1992); esta comienza a manifestarse entre los -70 y los -50 mV, alcanza un máximo alrededor de los $+30$ mV y decae a potenciales más positivos.

Figura 21. Relación I-V de la corriente activada por odorantes de la mezcla II. **A.** Corrientes dependientes de potencial gatilladas por la serie de pulsos de voltaje que se indican bajos los registros, en la ausencia de odorantes. **B.** Corrientes obtenidas con el mismo protocolo de pulsos de voltaje que en A, pero esta vez un estímulo de $30 \mu\text{M}$ de la mezcla I (barra) fue aplicado durante cada pulso de voltaje. Los pulsos de voltaje fueron aplicados en incrementos de 20 mV y separados por intervalos de 1 minuto. El voltaje de mantención de la célula fue de -70 mV. **C.** Gráfico de la corriente de salida inducida por la mezcla I en función del voltaje. Los valores en la ordenada corresponden a la diferencia entre la amplitud máxima de la corriente durante cada pulso de odorante y la corriente dependiente de voltaje obtenida por extrapolación.

5.3. Bases iónicas de la corriente de salida dependiente de odorantes.

Un punto importante en la caracterización de la corriente de salida dependiente de odorantes es determinar cuál es el ion portador de esta corriente. Esto fue abordado mediante estudios de sustitución de iones y con el uso de agentes farmacológicos.

5.3.1. Selectividad a K^+ de la corriente de salida inducida por odorantes.

Primeramente, se estudió el grado de selectividad de la corriente de salida inducida por la mezcla II al ion K^+ , comparando las curvas I-V de registros obtenidos en neuronas sometidas a dos concentraciones externas diferentes de K^+ . Si el potasio es el portador de esta corriente, es esperable un desplazamiento de la curva I-V en el eje del voltaje, de acuerdo al gradiente químico impuesto a través de la membrana celular. En la figura 22 se muestran las curvas I-V de las corrientes de salida registradas de una neurona expuesta a soluciones Ringer 2.5 mM y 0.25 mM de K^+ . Los círculos llenos representan las amplitudes de las corrientes de salida inducidas por la mezcla II cuando la célula fue perfundida con solución 2.5 mM de K^+ (Ringer normal), mientras que los círculos abiertos representan las amplitudes de las corrientes dependientes de odorantes cuando la neurona fue perfundida con solución 0.25 mM de K^+ . Como se aprecia, la curva obtenida en condiciones de bajo potasio se desplazó en el eje del potencial aproximadamente 25 mV hacia la izquierda de la curva en Ringer normal, en el sentido

esperado para una conductancia selectiva al K^+ . Sin embargo, el corrimiento fue dos veces más pequeño que el predicho por la ecuación de Nernst para una conductancia exclusivamente selectiva al K^+ , mostrando que esta conductancia de K^+ activada por odorantes es permeable también, aunque en menor medida, a otros cationes.

5.3.2. Selectividad al ion Cl^- de la corriente de salida dependiente de odorante.

En un segundo estudio se examinó si el Cl^- podría ser el ion portador de la corriente activada por la mezcla II. Este se realizó registrando corrientes iónicas en neuronas expuestas a diferentes gradientes químicos de Cl^- . La figura 23 muestra que las corrientes de salida inducidas por la mezcla II en dos neuronas diferentes, una dializada con solución interna que contiene 8.4 mM de Cl^- (gradiente = 15) y la otra dializada con solución interna que contiene 120 mM de Cl^- (gradiente = 1) son similares. En ambos casos el gradiente de K^+ fue el mismo. Las amplitudes promedios de las corrientes de salida registradas en ambas condiciones fueron muy similares: 56 ± 10 pA (promedio \pm D.S.) para la neurona dializada con bajo Cl^- ($n=15$) y 60 ± 18 pA (promedio \pm D.S.) para la neurona dializada con alto Cl^- ($n=17$). Estos resultados señalan que el ion Cl^- no contribuye significativamente a la corriente de salida activada por odorantes.

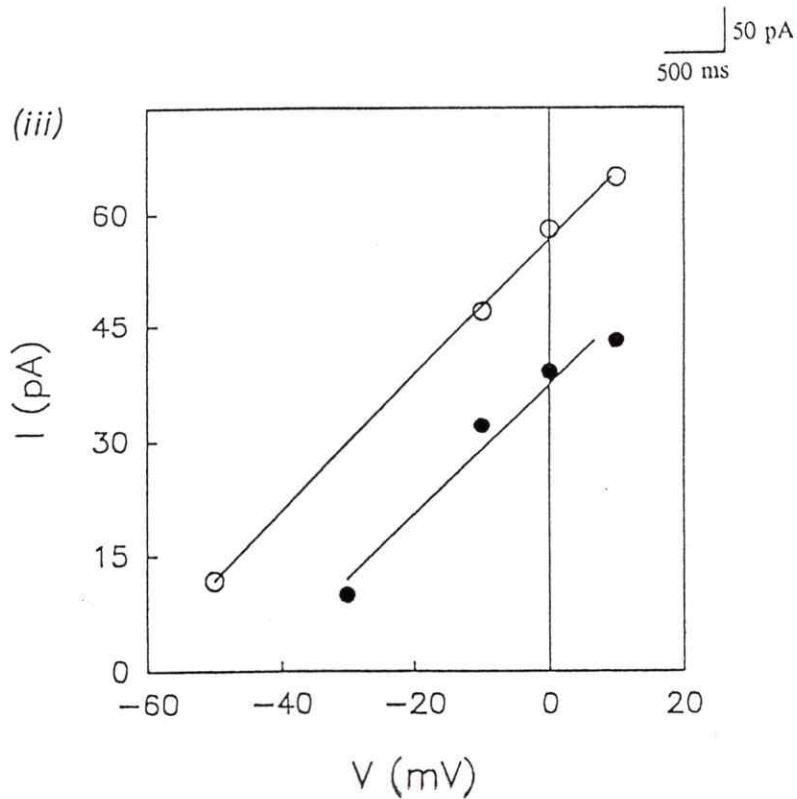
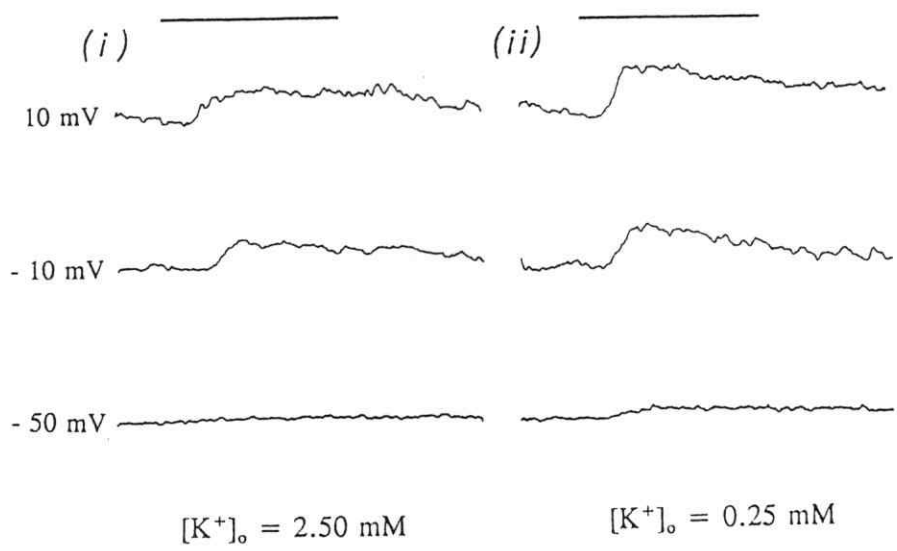


Figura 22

Figura 22. Selectividad a K^+ de la corriente de salida inducida por la mezcla II. Corrientes de salida activadas por $30 \mu M$ de odorantes de la mezcla II (barra) en una neurona olfatoria perfundida con solución 2.5 mM de K^+ (Ringer normal (i)) y solución Ringer 0.25 mM de K^+ (ii) a diferentes potenciales de membrana. La estimulación en cada condición experimental se realizó con los odorantes de la mezcla II disueltos en Ringer normal y en solución Ringer bajo K^+ , respectivamente. (iii) Relación I-V confeccionada con las amplitudes máximas de las corrientes dependientes de odorantes, obtenidas en condiciones de 2.5 mM de K^+ externo (círculos llenos) y de 0.25 mM de K^+ externo (círculos abiertos). Un corrimiento de aproximadamente 25 mV fue causado por la modificación del gradiente de K^+ .

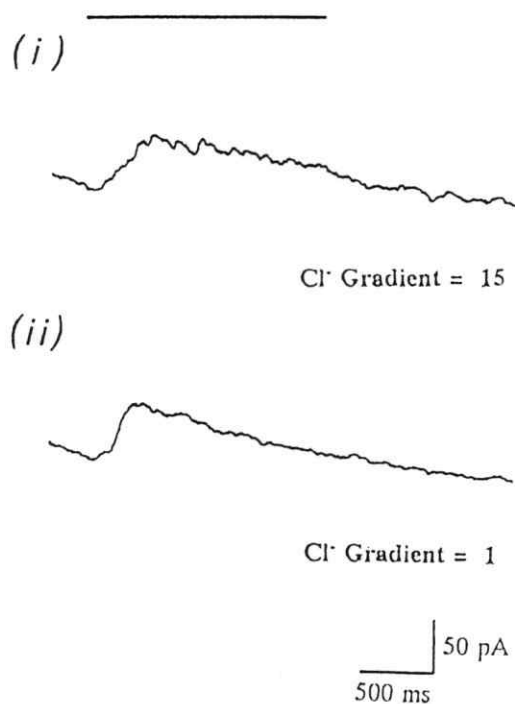


Figura 23. Efecto del gradiente de Cl⁻ sobre la corriente de salida inducida por odorantes. Corrientes de salida inducidas por 30 μ M de odorantes de la mezcla II en dos neuronas diferentes cuyo potencial fue mantenido en 0 mV. En (i) la neurona fue dializada con solución interna 8.4 mM de Cl⁻ (gradiente Cl⁻ = 15) y en (ii) la neurona fue dializada con solución interna 120 mM de Cl⁻ (gradiente de Cl⁻ = 1). La concentración externa de K⁺ fue la misma en ambos casos.

5.3.3. Efecto del TEA sobre la corriente de salida inducida por odorantes.

Como una prueba adicional de que la corriente inducida por odorantes es portada por K^+ , se examinó su sensibilidad a TEA, conocido bloqueador de canales de K^+ . La figura 24 muestra que el TEA bloqueó reversiblemente la corriente de salida inducida por odorantes. Se aprecia que la corriente de salida inducida por $10 \mu M$ de la mezcla II fue bloqueada en aproximadamente un 90% por la aplicación externa de 20 mM de TEA. Se observó una recuperación parcial de esta corriente después de removerse el TEA de la cámara experimental. Resultados similares se obtuvieron en otras 2 neuronas examinadas, apoyando la idea que el K^+ es el ion portador de la corriente de salida gatillada por odorantes de la mezcla II.

Las evidencias presentadas sugieren fuertemente que en el mecanismo de transducción de los odorantes de la mezcla II participa una conductancia selectiva a K^+ , que es responsable de la generación del potencial de receptor hiperpolarizante que inhibe la actividad eléctrica de las neuronas olfatorias.

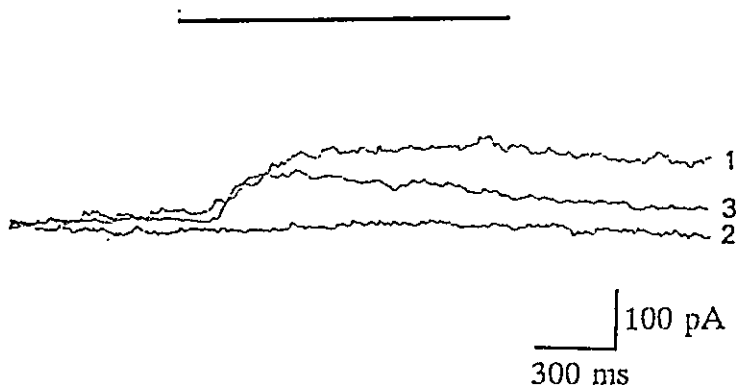


Figura 24. Efecto del TEA sobre la corriente de salida inducida por la mezcla II. En el trazo 1 se muestra la corriente de salida inducida por un pulso de $10 \mu\text{M}$ de la mezcla II (barra) aplicado a una neurona mantenida en 0 mV . En el trazo 2 se aprecia que la corriente inducida por odorantes fue abolida en aproximadamente un 90%, al aplicar el mismo pulso de la mezcla II suplementada con 20 mM de TEA (barra) a la neurona que fue previamente perfundida con Ringer 20 mM TEA. En el trazo 3 se ilustra la recuperación parcial de la corriente de salida inducida por odorante que se obtuvo después de remover el TEA de la cámara experimental.

6. Inhibición de la actividad eléctrica inducida por pulsos de corriente.

Las relaciones I-V de la corriente de salida, muestran que ésta es pequeña a potenciales cercanos al reposo. Teniendo en cuenta esto, surge la pregunta de si la corriente inducida por odorantes es lo suficientemente grande como para causar un efecto fisiológico en una célula que está a su potencial de reposo. Este problema fue abordado aplicando pulsos de corriente hiperpolarizantes de pequeña magnitud en células mantenidas en condiciones de corriente controlada con una I_{mant} de 0 pA. La figura 25 muestra que pulsos de tan sólo -1 ó -2 pA inhibieron la actividad de potenciales de acción. La inhibición fue gatillada por la generación de un potencial hiperpolarizante de 10 y 20 mV, respectivamente; estas magnitudes son comparables a las inducidas por odorantes (comparar figura 18 y 19 con figura 25). Esto mostró que la amplitud de la corriente de salida inducida por odorantes de la mezcla II es similar a la corriente hiperpolarizante que se necesitó inyectar en la célula para producir el mismo nivel de hiperpolarización.

Los resultados demuestran que la magnitud de las corrientes inducidas por odorantes son suficientes para producir la inhibición de la actividad eléctrica en neuronas olfatorias de vertebrado.

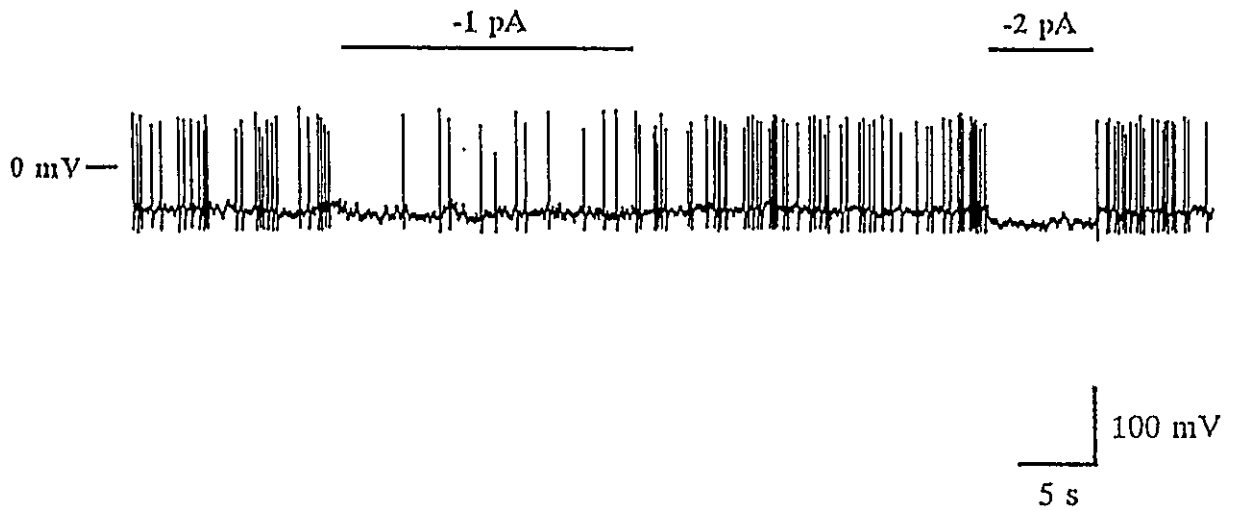


Figura 25. Inhibición de la actividad eléctrica inducida por pulsos de corriente en neuronas olfatorias aisladas. La descarga espontánea de potenciales de acción registrada en una neurona bajo condiciones de corriente controlada ($I_{\text{mant}} = 0$ pA) fue inhibida por la aplicación de -1 ó -2 pA de corriente (barras). Se aprecia que la hiperpolarización de la membrana fue de aproximadamente 10 y 20 mV, respectivamente. El potencial de reposo de la célula fue de -60 mV y su resistencia de entrada de 10 G Ω .

7. Localización ciliar de la respuesta inhibitoria inducida por odorantes.

Los cilios olfatorios son las estructuras de la neurona que están expuestos al medio externo y donde ocurre la quimiotransducción olfativa. Con la finalidad de determinar si la sensibilidad de las células olfatorias a odorantes que inhiben la actividad eléctrica se encuentra localizada en la membrana quimiosensorial de los cilios olfatorios, se compararon las respuestas obtenidas al estimular las neuronas en dos regiones: a nivel de los cilios olfatorios y a nivel del cuerpo celular o soma. La figura 26 muestra que el pulso de la mezcla II dirigido a los cilios olfatorios indujo una corriente de salida de mayor amplitud que el pulso dirigido al cuerpo celular, mostrando que la sensibilidad de la neurona a odorantes del tipo II se encuentra localizada en los cilios olfatorios. Además, la latencia que se observa en la activación de la corriente de salida fue mayor cuando la célula fue estimulada a nivel del soma. Esto puede deberse al retardo difusional que experimentan los odorantes para llegar a los cilios olfatorios. Resultados similares se obtuvieron en otras 2 neuronas.

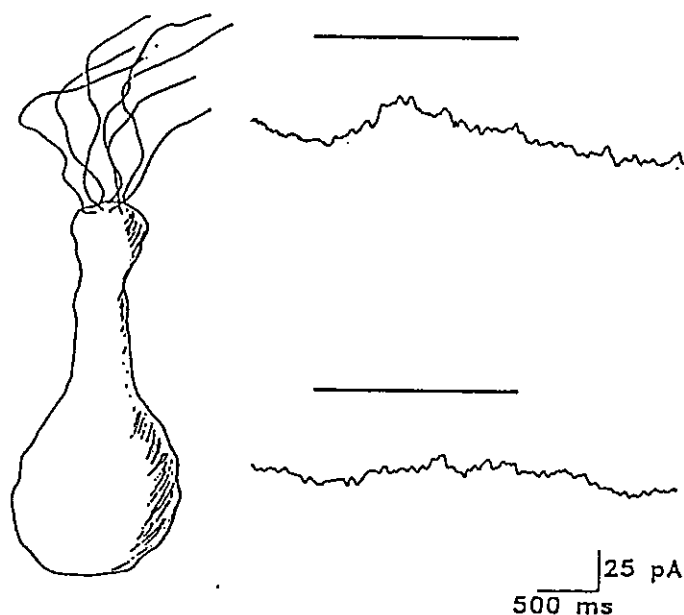


Figura 26. Localización del efecto inhibitorio inducido por la mezcla II en neuronas olfatorias de sapo. Representación esquemática de la neurona olfatoria aislada utilizada en este experimento. En el trazo superior se muestra la corriente de salida inducida al aplicar $45 \mu\text{M}$ de odorantes de la mezcla II (barra) sobre los cilios olfatorios. En el trazo inferior se ilustra la corriente inducida por un estímulo idéntico al anterior, pero esta vez aplicado al nivel del cuerpo celular. Se aprecia que esta respuesta es de menor amplitud a la obtenida en la región ciliar.

8. La conductancia de K^+ responsable de la respuesta inhibitoria inducida por odorantes es activada por Ca^{2+} .

8.1. Caracterización de la corriente de K^+ que participa en la respuesta inhibitoria inducida por odorantes.

8.1.1. Curvas I-V de la corriente de K^+ inhibitoria inducida por odorantes.

Los resultados presentados hasta aquí demuestran que la inhibición de la actividad eléctrica gatillada por odorantes ocurre a través de la activación de una corriente de salida hiperpolarizante portada por K^+ . El análisis de las curvas I-V de estas corrientes sugirió la participación de una conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} en esta respuesta (ver sección 5.2. y figura 21). Debido a la dificultad experimental que significa exponer a la célula durante largos períodos de tiempo a potenciales extremos (hay que recordar que cada registro de corriente dura aproximadamente 5 segundos) este estudio fue realizado en un rango estrecho de potenciales positivos. Para confirmar que las relaciones I-V de las corrientes de salida dependientes de olor disminuyen hacia valores de voltaje positivos, de manera similar a la de una conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} (Hille, 1992), el estudio de las curvas I-V se extendió hacia potenciales más positivos (desde -50 hasta +80 mV) y usando protocolos con un menor número de pulsos. La figura 27 muestra que la corriente inhibitoria evocada por la mezcla II alcanza una amplitud máxima a +20 mV y decae hacia potenciales más positivos,

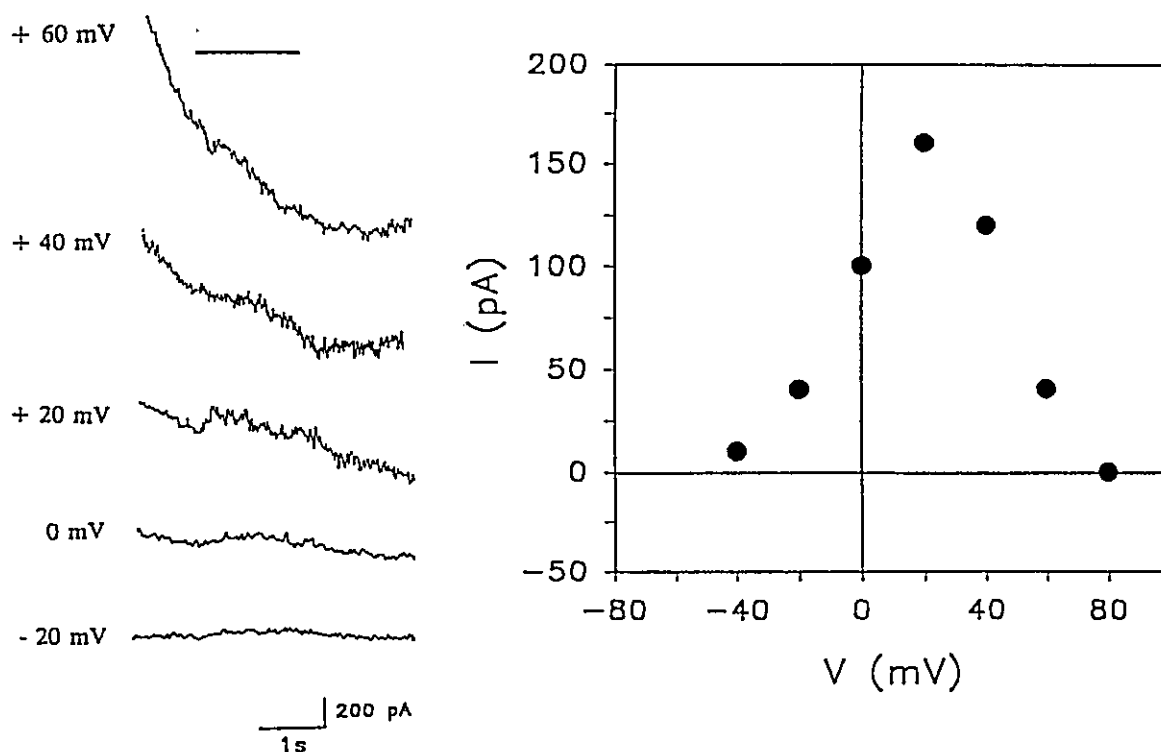


Figura 27. Relación I-V de la corriente de K^+ inhibitoria inducida por odorantes de la mezcla II. A la izquierda se muestran las corrientes de salida inducidas por $40 \mu M$ de la mezcla II registradas en una neurona mantenida a los voltajes especificados junto a cada registro. El rango de voltajes positivos fue extendido con respecto al empleado en los experimentos descritos en la sección 6.2. A la derecha se muestra el gráfico I-V confeccionado con los datos del experimento anterior los cuales se obtuvieron mediante el procedimiento descrito en la figura 21.

posiblemente debido a la disminución en la entrada de Ca^{2+} a la célula. Observaciones similares se hicieron en otras 2 neuronas analizadas, sugiriendo participación de una conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} en la respuesta inhibitoria inducida por odorantes.

8.1.2. Sensibilidad a caribdotoxina (CTX) de la corriente de K^+ inhibitoria inducida por odorantes.

La caribdotoxina (CTX) es una toxina ampliamente usada en la caracterización de canales de K^+ activados por Ca^{2+} . La constante de afinidad aparente de esta toxina por los canales de K^+ activados por Ca^{2+} , especialmente el de alta conductancia, es del orden nanomolar (Latorre y cols., 1989). En esta Tesis se examinó el efecto de este bloqueador sobre la corriente inhibitoria inducida por odorantes. La figura 28 muestra que la corriente de salida inducida por $60 \mu M$ de la mezcla II es bloqueada reversiblemente por $10 nM$ de CTX. Esta es otra indicación de la participación de una conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} en el fenómeno de la inhibición.

El efecto del CTX fue específico sobre la corriente de salida inducida por odorantes. La perfusión de la célula con Ringer $10 nM$ de CTX no afectó la corriente de salida dependientes de voltaje. El inserto de la figura 28 muestra las corrientes totales del experimento anterior. En ella se puede apreciar que la corriente de K^+ activado por Ca^{2+} inducida por odorantes fue inhibida por la CTX, sin embargo no afectó la corriente de salida de K^+ inducida por el pulso de voltaje, que tiene un componente importante de K^+ activado por Ca^{2+} . Resultados similares a los anteriores fueron observados en todas las neuronas estudiadas ($n=5$), demostrando que la corriente de salida inhibitoria inducida por odorante es sensible a CTX en el rango de sensibilidad que presentan las conductancias de K^+ activada por Ca^{2+} . Esta evidencia confirma la idea de la posible participación de una conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} localizada en los cilios

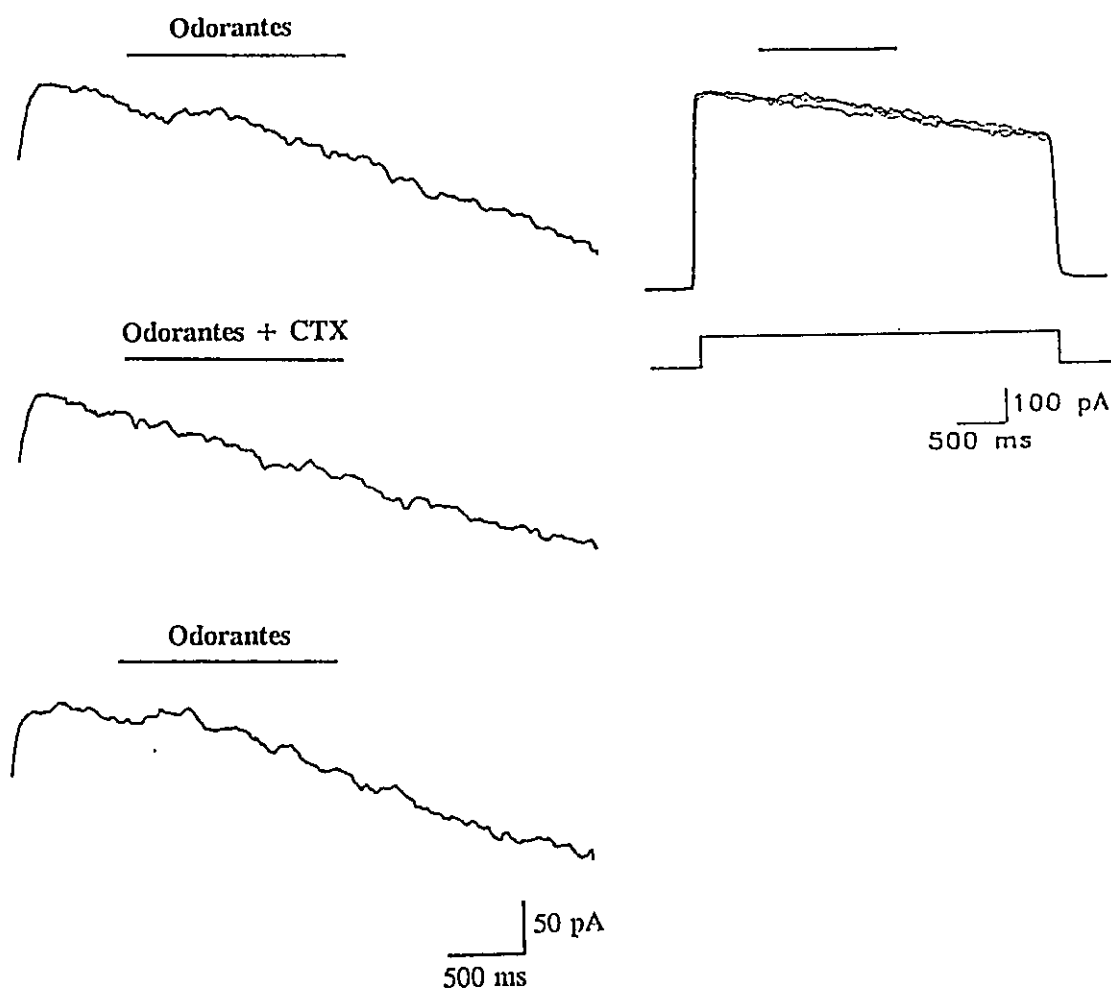


Figura 28. Efecto del CTX sobre la corriente de salida inducida por odorantes de la mezcla II. Las células bajo un potencial mantenido de -70 mV, fueron estimuladas con la mezcla II, 500 ms después de despolarizar la neurona a 0 mV. En el trazo superior se muestra la corriente de salida inducida por $60 \mu\text{M}$ de la mezcla II (barra). Esta corriente fue bloqueada al estimular la neurona con un pulso de $60 \mu\text{M}$ de la mezcla II suplementada con 10 nM de CTX (trazo central). Una recuperación casi total de la corriente inducida por la mezcla II fue observada al remover el CTX (trazo inferior). Inserto: las 3 corrientes superpuestas y mostradas a una escala diferente para ilustrar que el CTX no afectó las corrientes dependientes de voltaje.

olfatorios, en la respuesta inhibitoria inducida por odorantes de la mezcla II.

8.1.3. El potencial de receptor inhibitorio es bloqueado por CTX.

Este estudio se realizó en condiciones de corriente controlada, bajo las cuales es posible estudiar el potencial de receptor hiperpolarizante inducido por odorantes. En la figura 29 se muestran los resultados obtenidos en este estudio. Se aprecia que el potencial de receptor hiperpolarizante inducido por la mezcla II en la misma neurona del experimento anterior fue bloqueado reversiblemente con 10 nM de CTX. Observaciones similares se hicieron en otras 2 neuronas olfatorias, demostrando que al igual que la corriente de K^+ inhibitoria, la hiperpolarización inducida por odorantes también es sensible a CTX. Esta evidencia sugiere que el potencial de receptor hiperpolarizante es generado por la activación de una corriente de K^+ activada por Ca^{2+} .

Los resultados apoyan la hipótesis que en el mecanismo de transducción de los odorantes inhibitorios participa un canal de K^+ activado por Ca^{2+} .

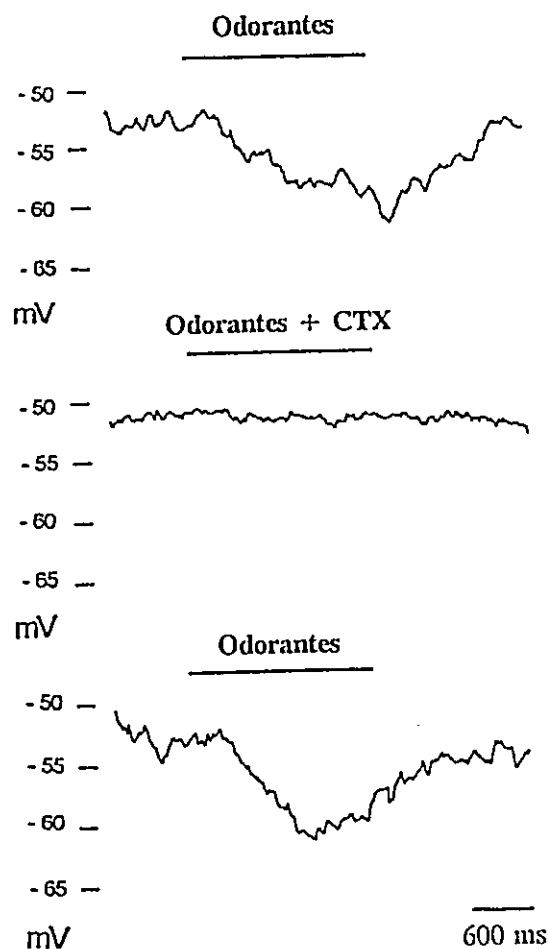


Figura 29. Efecto del CTX sobre el potencial de receptor hiperpolarizante inducido por odorantes de la mezcla II. La aplicación de un pulso de $60 \mu\text{M}$ de la mezcla II (barra) sobre la misma neurona del experimento mostrado en la figura 28 pero en condiciones de I-controlada ($I_{\text{mant}} = 0 \text{ pA}$), indujo una hiperpolarización del potencial de membrana (trazo superior). Este efecto fue bloqueado al aplicar un pulso idéntico al anterior suplementado con 10 nM de CTX (trazo central). La neurona fue previamente perfundida con Ringer 10 nM de CTX. Un estímulo aplicado después de remover el CTX indujo una nueva respuesta (trazo inferior).

9. Participación del Ca^{2+} externo en la respuesta inhibitoria inducida por odorantes.

9.1. Efecto del Ca^{2+} externo sobre la conductancia de K^+ inducida por odorantes.

La presencia de una conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} en el mecanismo de transducción de los odorantes de la mezcla II sugirió la participación del Ca^{2+} en la respuesta inhibitoria. Por ello fue fundamental establecer la función de éste ion en la respuesta inducida por odorantes. Esto, a su vez, permitirá dar luz sobre las últimas etapas de la vía de transducción de estos odorantes. La figura 30 muestra que la corriente de salida inducida por $65 \mu\text{M}$ de la mezcla II fue completamente abolida al perfundir las células con solución Ringer en la cual la concentración de Ca^{2+} fue llevada a 10 nM con el quelante EGTA. Resultados similares se obtuvieron en otras 3 neuronas. Esta evidencia indica por una parte que el Ca^{2+} es importante en la respuesta inhibitoria inducida por odorantes y por otra, sugiere que el Ca^{2+} involucrado en la activación del canal de K^+ proviene desde el medio externo.

9.2. Sensibilidad a nifedipina de la corriente inhibitoria inducida por odorantes.

El resultado anterior permite suponer que el Ca^{2+} implicado en la respuesta inhibitoria, ingresaría a la célula desde el medio externo a través de un canal de Ca^{2+}

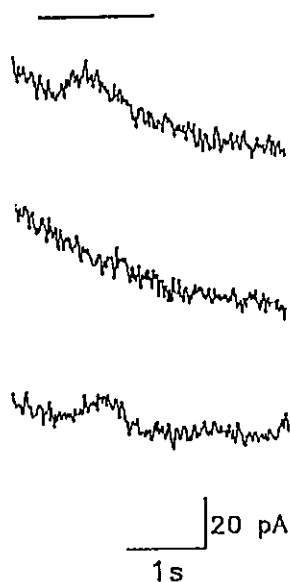


Figura 30. Efecto del Ca^{2+} externo sobre la corriente de salida inducida por odorantes de la mezcla II. Corriente de salida inducida por $65 \mu\text{M}$ de la mezcla II (barra) registrada en Ringer normal (trazo superior). La mezcla de odorantes fue aplicada mientras la neurona permanecía a un potencial de membrana de 0 mV . La corriente fue abolida al perfundir la neurona con solución Ringer 10 nM de Ca^{2+} (trazo central). La mezcla de odorantes también fue aplicada en solución bajo Ca^{2+} . Una nueva respuesta se indujo al volver a las condiciones control (trazo inferior).

presente en la membrana celular de la neurona olfatoria. Esta hipótesis fue sometida a prueba usando un bloqueador de canales de Ca^{2+} , la nifedipina. En todos los casos examinados ($n=3$) las neuronas olfatorias expuestas a solución Ringer con $55 \mu\text{M}$ de nifedipina fueron incapaces de responder a odorantes de la mezcla II (figura 31). La

reversibilidad del efecto de la nifedipina se observó al remover la droga desde la cámara experimental (figura 31). Los resultados sugieren fuertemente la participación de un canal de Ca^{2+} en la maquinaria de transducción de los odorantes de la mezcla II.

9.3. Sensibilidad a nifedipina del potencial de receptor hiperpolarizante inducido por odorantes.

El efecto de la nifedipina también se probó sobre el potencial de receptor hiperpolarizante inducido por odorantes. En la figura 32 se muestran registros de voltaje obtenidos bajo corriente controlada de la misma neurona utilizada en el experimento anterior. Se observa que $55 \mu\text{M}$ de nifedipina bloquearon reversiblemente hasta en un 80% el potencial de receptor hiperpolarizante inducido por la mezcla II, confirmando la idea de la participación del Ca^{2+} externo como un intermediario en el mecanismo de quimiotransducción de los odorantes de la mezcla II.

El conjunto de las evidencias presentadas en esta sección señalan que el Ca^{2+} sería un intermediario en el mecanismo de quimiotransducción de los odorantes de la mezcla II. Su participación en este proceso sería a través de la activación de una conductancia de K^+ responsable de generar el potencial de receptor hiperpolarizante que inhibe la actividad eléctrica en neuronas olfatorias. El origen del Ca^{2+} involucrado en esta respuesta es extracelular, entrando a la célula posiblemente a través de canales de Ca^{2+} localizados en la membrana de los cilios olfatorios.

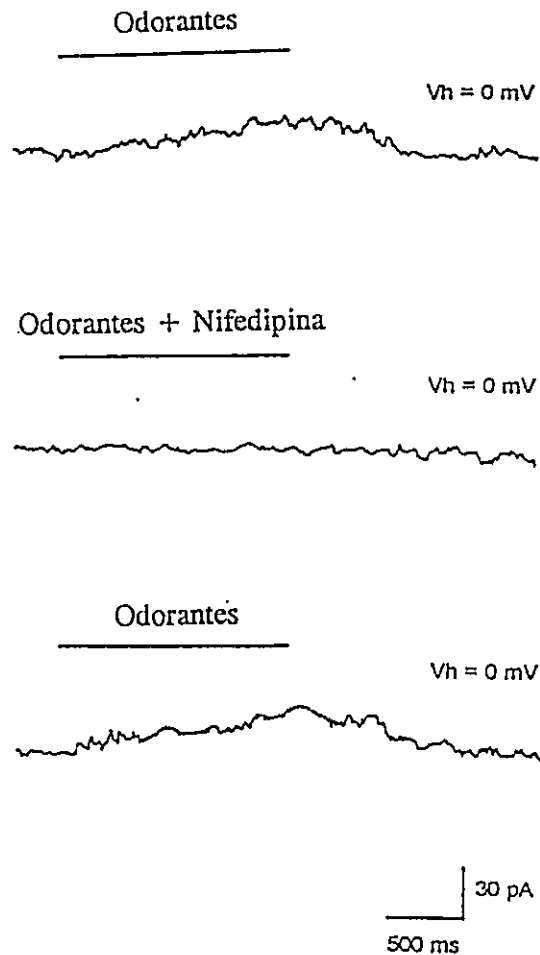


Figura 31. Efecto de la nifedipina sobre la corriente dependiente de odorantes. A. Corriente de salida inducida por $55 \mu\text{M}$ de la mezcla II (barra) registrada en una neurona con un V_{mant} de 0 mV (trazo superior). La corriente fue inhibida completamente al aplicar un pulso de $55 \mu\text{M}$ de la mezcla II suplementada con $25 \mu\text{M}$ de nifedipina (trazo central) sobre la neurona previamente perfundida con Ringer conteniendo $25 \mu\text{M}$ de nifedipina. El efecto cesó al remover la nifedipina de la cámara experimental (trazo inferior).

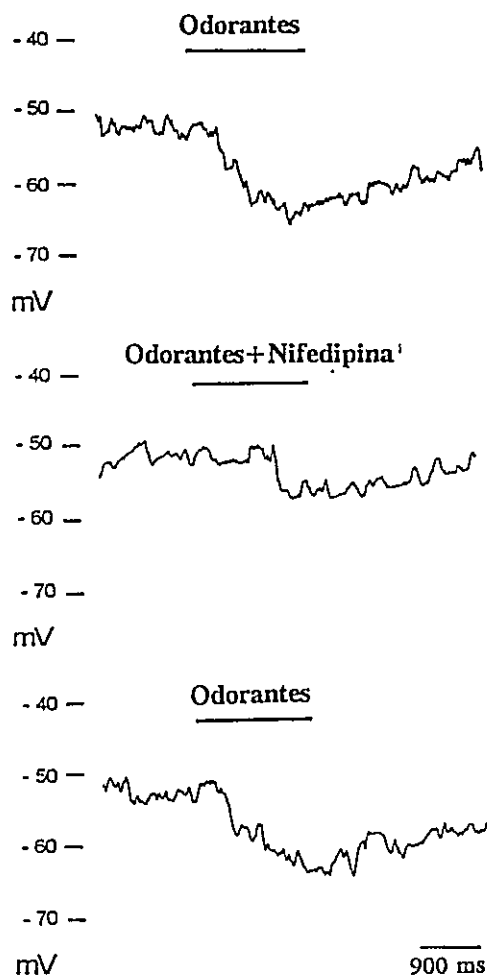


Figura 32. Efecto de la nifedipina sobre el potencial de receptor hiperpolarizante inducido por la mezcla II. La misma neurona del experimento mostrado en la figura 31 mantenida a una I_{mant} de 0 pA, responde con una hiperpolarización de 10 mV al ser estimulada con 55 μM de la mezcla II (trazo superior). 25 μM de nifedipina bloquearon la respuesta inducida por la mezcla II (trazo central), la cual se recuperó después de remover la droga de la cámara experimental (trazo inferior).

10. Corriente de Ca^{2+} inducida por odorantes inhibitorios.

Los resultados presentados sugieren que en el mecanismo de transducción de los odorantes de la mezcla II se requiere la participación de una conductancia de Ca^{2+} inducida por odorantes. Se intentó medir esta corriente en condiciones de 10 mM Ca^{2+} externo pero no fue posible registrarla. Esto es esperable dado que una estimación de la corriente de Ca^{2+} que se necesita para aumentar la concentración ciliar a 46 μM (concentración para que el canal de K^+ activado por Ca^{2+} ciliar tenga una probabilidad de estar en el estado abierto de igual a 0.5, Jorquera y cols., 1995) en una célula típica con 10 cilios, es de aproximadamente 0.1 pA*. Para aumentar la magnitud de esta corriente de Ca^{2+} inducida por odorantes, se realizaron experimentos exponiendo las células a soluciones en que el único ion permeante es el Ba^{2+} , ya que es sabido que los canales de Ca^{2+} conducen mejor el Ba^{2+} que el Ca^{2+} (Hille, 1992). El 14.6% de las células estimuladas con la mezcla II, 7 de un total de 48 neuronas, respondieron con la generación de una corriente de entrada de Ba^{2+} cuya amplitud promedio fue de 4.4 ± 2.1 pA (promedio \pm D.S.). La figura 33 muestra un experimento en que la mezcla II, inducen una corriente de aproximadamente 6 pA. Esta evidencia sugiere que los odorantes de la mezcla II activan una conductancia de Ca^{2+} .

* Este cálculo se realizó empleando el volumen de 10 cilios olfatorios (2×10^{-14} l). Los moles necesarios para alcanzar una concentración de 46 μM en este volumen es de 9.2×10^{-19} . Los iones contenidos en este número de moles son 554116. Por lo tanto, sabiendo que la carga de un electrón es de 1.6×10^{-19} coulombios, la carga de la 554116 moléculas resulta ser de 9×10^{-14} coulombios. El movimiento de esta carga genera una corriente de aproximadamente 0.1 pA.

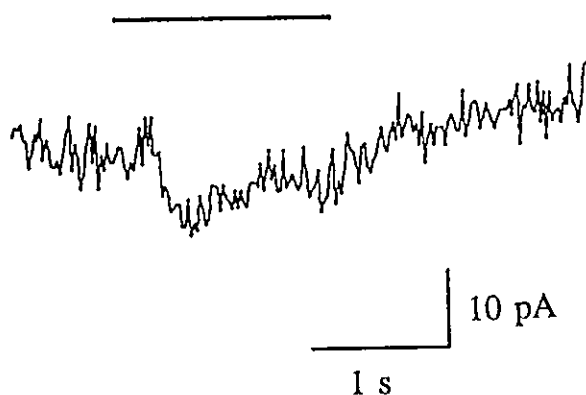


Figura 33. Corriente de entrada de Ba^{2+} inducida por odorantes de la mezcla II. Se muestra la corriente entrada inducida por $45 \mu M$ de la mezcla II, registrada a un potencial de mantención de -30 mV. El Na^+ del Ringer externo fue reemplazado por el N-metil-D-glucamina (catión que no permea la membrana), los 2 mM de Ca^{2+} por 10 mM de Ba^{2+} y se agregaron 20 mM de TEA, para bloquear los canales de K^+ . El KCl de la solución de llenado de la pipeta (solución interna, ver tabla 3) fue reemplazado por CsCl.

Los resultados presentados muestran que en la transducción de odorantes de la mezcla II participa una conductancia de Ca^{2+} que podría ser activada por un mensajero secundario. Esto, permitiría el aumento de la concentración de Ca^{2+} en el lumen de los cilios activando así la corriente de K^+ activada por Ca^{2+} dependiente de odorantes.

DISCUSION

Las neuronas olfatorias son células que transforman un estímulo químico (odorantes) en una señal eléctrica que viaja al sistema nervioso central, donde ésta es integrada para dar curso a la sensación olfativa. La información proveniente del epitelio, es primero transmitida al bulbo olfatorio, como trenes de potenciales de acción. Hasta hace poco las evidencias permitían sostener que este código de transmisión era generado por un aumento en la frecuencia de potenciales de acción inducido por odorantes. En este trabajo se demuestra que la disminución de la frecuencia también puede ser importante en la generación de este código.

En esta Tesis se estudió el efecto inducido sobre la actividad eléctrica de neuronas olfatorias por dos mezclas de odorantes: una formada por olores florales y frutales que activan la adenilil ciclasa (mezcla I) y la otra, por olores de la clase pútridos que no estimulan esta enzima (mezcla II). Los principales resultados que se obtuvieron en este trabajo de tesis son los siguientes: 1) se establece claramente la existencia del fenómeno de la inhibición, inducido por odorantes de la mezcla II, 2) se demuestra en forma directa que una misma neurona es capaz de responder excitatoria e inhibitoriamente, dependiendo del estímulo a la que es expuesta, 3) se identificó y

caracterizó la conductancia involucrada en el fenómeno de la inhibición como una conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} , y 4) se estableció la participación del ion Ca^{2+} en este mecanismo. Se presentan evidencias que sugieren que la transducción de los odorantes que inducen inhibición en neuronas olfatorias de vertebrados operaría a través de un mecanismo diferente al de la cascada del AMPc.

1. Fenómeno inhibitorio inducido por odorantes.

Como condición fundamental para el estudio del efecto de odorantes sobre la actividad eléctrica de las neuronas olfatorias de *C. caudiverbera*, fue necesario previamente conocer algunas propiedades eléctricas básicas de estas células.

1.1. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas olfatorias aisladas en la ausencia de estímulo químico.

Las neuronas aisladas presentaron una actividad espontánea de potenciales de acción, en la ausencia de estímulo químico, la que varió de célula a célula. En su gran mayoría estas células mostraron una elevada descarga espontánea de potenciales de acción (150 PA/min), aunque una pequeña fracción de ellas (< al 10%) no presentaron esta actividad. Considerando que el epitelio olfatorio está en continua neurogénesis para

renovar las neuronas dañadas por el estrés mecánico, este amplio intervalo de frecuencia puede reflejar los diferentes estados de madurez de las células, o bien corresponden a diferencias en las propiedades eléctricas pasivas o activas entre células maduras.

La frecuencia promedio de potenciales de acción espontáneos obtenida en este estudio (37 PA/min), representa un valor intermedio comparado con los obtenidos en rata (< 3 PA/min; Maue y Dionne, 1987), tortuga (~ 3 PA/min; Mathews, 1972), rana (3 PA/min; O'Connell y Mozell, 1969; Frings y Lindemann, 1991; y 20 PA/min; Holley y cols., 1974, 1984), salamandra (20 PA/min; Getchell y Shepherd, 1978; y 50 PA/min; Baylin, 1979) y pez gato (288 PA/min; Kang y Caprio, 1995). Es importante destacar que no todas las especies tienen neuronas olfatorias con descargas espontánea de potenciales de acción; las células de la salamandra japonesa *Cynops pyrrhogaster*, por ejemplo, carecen de esta actividad eléctrica (Yau, comunicación personal).

La actividad espontánea de las neuronas olfatorias del sapo podría originarse de la apertura al azar de canales iónicos. Dada la alta resistencia de entrada presentada por estas células, bastaría una corriente de entrada de unos pocos picoamperios para inducir una despolarización suficiente para que se origine la descarga de potenciales de acción. Por el contrario, una corriente hiperpolarizante de magnitud comparable induciría una inhibición en la descarga espontánea de potenciales de acción. Este aspecto es demostrado en los ejemplos que se ilustran en las figuras 8 y 27. Es importante aclarar que en rigor, quizás no existen en estos experimentos, así como en las de otros investigadores, una condición en que haya ausencia total de odorantes. Es concebible entonces, que esta actividad espontánea pudiese surgir de la acción iniciada por una

pocas moléculas de odorantes presentes en el ambiente. Sin embargo, esta posibilidad es poco probable en el caso de células aisladas, porque estas presentan un umbral por sobre los 100 nM de odorantes, sugiriendo que la actividad basal es producto de la apertura al azar de canales iónicos.

1.2. Inhibición de la actividad eléctrica inducida por odorantes.

Las evidencias obtenidas en la primera parte de esta Tesis demostraron que los odorantes de la mezcla I inducen un aumento en la frecuencia de potenciales de acción de una manera dependiente de su concentración. Durante años el estudio de la fisiología de la olfacción se centró en estudiar la respuesta excitatoria como la única forma que tendrían los receptores olfatorios para codificar la información que éstas captaban proveniente del medio externo. Estudios recientes mostraron que en algunas ocasiones las neuronas olfatorias aisladas de *Necturus* responden con una inhibición en la descarga de potenciales de acción al ser estimuladas con una mezcla de aminoácidos (Dionne, 1992). Aunque ese fue el primer estudio de inhibición en neuronas olfatorias aisladas, los resultados presentados ahí no fueron concluyentes para demostrar el fenómeno inhibitorio. En los registros mostrados no es posible ver, por una parte la actividad espontánea de las células y por otra la reversibilidad del efecto inhibitorio. Además, no se presenta ningún análisis estadístico de los registros que permitan demostrar dicha inhibición. En esta Tesis se muestra por primera vez que los odorantes de la mezcla II,

inducen una inhibición de la actividad eléctrica espontánea en células aisladas de *C. caudiverbera*, demostrando claramente la existencia del fenómeno inhibitorio en vertebrados. En las células que mostraron sensibilidad a la mezcla II, la inhibición fue específica para estos odorantes y se encontró de manera consistente cada vez que éstas fueron estimuladas. Previamente, se habían hecho observaciones de respuesta inhibitoria en neuronas olfatorias de rana (Gesteland y cols., 1965; O'Connell y Mozell, 1969; Duchamp y cols., 1974; Revial y cols., 1978) y salamandra (Getchell y Shepherd, 1978a) usando microelectrodos. Sin embargo, debido a la baja frecuencia en la detección de este fenómeno y a la falta de claridad de estos resultados, varios autores cuestionaron la existencia de este fenómeno en vertebrados. En este trabajo el 36% de la neuronas olfatorias examinadas (n=28) responden con una inhibición de la actividad eléctrica al ser estimuladas con odorantes de la mezcla II, sugiriendo que este fenómeno al igual que la excitación también puede jugar un papel importante en el proceso de la percepción olfativa en vertebrados. Recientemente, Kang y Caprio (1995) encontraron que el 25% de las neuronas olfatorias de pez gato estimuladas, respondieron a L-alanina con una inhibición en la descarga de potenciales de acción de características similares a las observadas en el sapo.

La inhibición en neuronas de invertebrados ha sido claramente establecida. En langosta marina, Michel y Ache (1994) encontraron que la L-prolina inhibe la descarga de potenciales de acción. Esta inhibición presenta características semejantes a la producida por los odorantes volátiles usados en esta Tesis. Resultados similares han sido encontrados en neuronas de abeja (Akers, 1992) y de calamar (Lucero y cols., 1992).

2. Respuestas excitatorias e inhibitorias inducidas por odorantes en una misma neurona olfatoria.

En *Necturus maculosus*, Dionne (1992) encontró que un mismo aminoácido puede tener en algunas neuronas un efecto excitatorio y puede causar inhibición en otras. Como los porcentajes tanto de células que generaron respuesta excitatorias como aquéllas que produjeron respuesta inhibitoria eran mayores que el 50%, Dionne concluyó que algunas neuronas olfatorias serían capaces de generar ambos tipos de respuestas. En esta Tesis, empleando la modalidad de célula adherida a la pipeta, se demostró por primera vez en forma directa que una misma neurona olfatoria puede generar respuestas tanto excitatorias como inhibitorias, dependiendo de la mezcla con la que es estimulada (figura 15). Las células respondieron con un aumento en la descarga de potenciales de acción al ser estimuladas con odorantes de la mezcla I. En cambio, ellas respondieron con una inhibición al ser estimuladas con olores de la mezcla I. Este efecto diferencial inducido por odorantes también fue observado usando la modalidad de célula completa en condiciones de voltaje controlado y corriente controlada. Los agentes químicos que gatillaron una corriente de entrada generaron un potencial de receptor despolarizante, en tanto aquellos que indujeron una corriente de salida generaron un potencial de receptor hiperpolarizante. Estas evidencias confirmaron la proposición de Dionne y sugirieron, además, que el mecanismo que opera en la transducción de ambos grupos de odorantes es diferente: uno está asociado a la respuesta excitatoria y otro a la respuesta inhibitoria. Ambos mecanismos pueden darse en una

misma célula. Recientemente, Kang y Caprio (1995), haciendo registros *in vivo*, mostraron que las neuronas olfatorias del pez gato pueden también generar respuestas excitatorias e inhibitorias, muy similares a las observadas en este trabajo. También encontraron que una misma neurona olfatoria puede producir ambos tipos de respuesta, aunque no dieron evidencias sobre el mecanismo de transducción involucrado en este fenómeno.

La importancia del fenómeno inhibitorio para la percepción olfativa aún no es entendida y cualquier sugerencia caería en el campo de lo especulativo. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos en esta Tesis, es posible proponer un significado funcional a la respuesta inhibitoria. Se ha sugerido que la discriminación de odorantes está basada, entre otros motivos, en diferentes patrones de potenciales de acción formados por respuestas excitatorias. Si ahora sumamos la inhibición, es posible extender la formación de códigos de potenciales de acción a un rango más amplio. Este supuesto adquiriría mayor importancia en aquellos animales que son capaces de percibir un universo importante de odorantes como es el caso del perro, el hombre y otros mamíferos, permitiendo de esta forma una mejor adaptación al medio.

3. Conductancia involucrada en la generación del fenómeno inhibitorio.

En la respuesta excitatoria ha sido claramente establecida la participación de una corriente de entrada sensible a odorantes que induce el potencial de receptor excitatorio

(esta tesis; Firestein y cols., 1991a, 1991b; Zufall y cols., 1991; Kurahashi, 1989, 1990; Morales y cols., manuscrito en preparación). En cambio, el mecanismo asociado al fenómeno inhibitorio era prácticamente desconocido. Dionne (1992) mostró que la supuesta respuesta inhibitoria inducida por los aminoácidos en las neuronas olfatorias de *Necturus* fue generada por un potencial de receptor hiperpolarizante, sin encontrar la corriente responsable de tal potencial. En el presente trabajo se demuestra claramente que los odorantes que inhiben la actividad espontánea en neuronas olfatorias de vertebrados, activan una corriente de salida que genera un potencial de receptor hiperpolarizante.

Una serie de evidencias permitieron establecer que esta corriente de salida gatillada por odorantes es portada principalmente por el ion K^+ . Primero, se encontró que el desplazamiento de la curva I-V, al variarse el gradiente de K^+ , fue en el sentido esperado para una conductancia selectiva a K^+ . Segundo, el signo del potencial de inversión de la corriente activada por odorantes de la mezcla II no cambió al variarse el gradiente de Cl^- a través de la membrana. Esto descarta la participación de la corriente de Cl^- activada por Ca^{2+} , recientemente descrita en cilios de neuronas olfatorias de rana (Kleene y Gesteland, 1991; Kurahashi y Yau, 1993), en la respuesta inhibitoria inducida por odorantes. Como se mencionó anteriormente, esta conductancia es gatillada por odorantes excitatorios y participa en la generación del potencial de receptor excitatorio (Kurahashi y Yau, 1993). Además, la farmacología de la corriente de salida gatillada por odorantes fue compatible con una conductancia selectiva a K^+ . La aplicación externa de TEA, bloqueó reversiblemente la corriente de salida activada

por odorantes y tanto la corriente como el potencial de receptor hiperpolarizante fueron bloqueados reversiblemente por CTX. En resumen las evidencias presentadas demuestran por primera vez que la inhibición en las neuronas olfatorias del sapo opera a través de una conductancia selectiva a K^+ .

La participación de una conductancia de K^+ en respuestas quimiosensoriales ha sido sugerida en células olfatorias de *Necturus* (Dubin y Dionne, 1993, 1994) y pez gato (Miyamoto y cols., 1992). En *Necturus*, Dubin y Dionne (1993) encontraron que la taurina (odorante para este animal) disminuye la conductancia de potasio. Ellos sugieren que ésto puede desestabilizar localmente el potencial de membrana apical, permitiendo que una pequeña corriente produzca una despolarización que inactive canales dependientes de voltaje e induzca así la inhibición en la descarga de potenciales de acción observada en estas neuronas. Los datos presentados en esta Tesis, en tanto, demuestran claramente que la inhibición inducida por odorantes de la mezcla II es producida a través de un aumento en la conductancia de K^+ . Esta corriente de salida dependiente de olor también fue observada en las neuronas olfatorias de *Xenopus laevis*, por lo cual esta evidencia puede ser extendida a otras especies de vertebrados.

Las características de la corriente inducida por la mezcla I difieren considerablemente de las mostradas para la corriente inducida por la mezcla II. Estas diferencias pueden resumirse en su selectividad y su farmacología. La corriente de salida inhibitoria es portada por K^+ , en tanto la corriente de entrada excitatoria es portada principalmente por Na^+ , Ca^{2+} y también por Cl^- ; el potencial de inversión de la corriente de salida es claramente más negativo que el de la corriente inducida por

odorantes que activan la adenilil ciclasa. Por otro lado, la corriente de salida es sensible a TEA y a CTX, mientras que la corriente de entrada es insensible a estos agentes, pero es sensible a L-cis diltiazem (Zufall y cols., 1994).

Las curvas dosis-respuesta de la excitación e inhibición son similares y ambas presentan una forma sigmoídea (Firestein y Werblin, 1989; Firestein y cols., 1990). El análisis de las curvas de la corriente de salida inducida por odorantes mostró que la respuesta inhibitoria es un proceso cooperativo con un coeficiente de Hill promedio de 2.1, muy similar al encontrado para los odorantes excitatorios en salamandra (Firestein y Werblin, 1989) y en este mismo sapo (Morales y cols., resultados no publicados). Por otro lado, el rango dinámico en que las neuronas olfatorias responden a odorantes de la mezcla II fue aproximadamente de una unidad logarítmica, intervalo similar al observado para odorantes excitatorios (Getchell y Shepherd, 1978a; Getchell, 1986; Firestein y Werblin 1989; Firestein y cols., 1990). La dosis-dependencia de la corriente inhibitoria presentada aquí es la primera y la única disponible por el momento para neuronas olfatorias de vertebrados.

En esta Tesis también se demostró que la conductancia de K^+ involucrada en el fenómeno inhibitoria es activada por Ca^{2+} . Esta demostración se basó en las siguientes evidencias: primero, la relación I-V de la corriente inhibitoria gatillada por odorantes es semejante a la que presenta una conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} , incluyendo la de neuronas olfatorias (Schild, 1989; Trotier, 1986; Firestein y Werblin, 1987; Miyamoto y cols., 1992; Delgado y Labarca 1993); segundo, la corriente de salida activada por odorantes depende del Ca^{2+} externo; tercero, la sensibilidad a CTX de la

corriente de salida y de la hiperpolarización inducidas por odorantes, es consistente con la farmacología de canales de K^+ activado por Ca^{2+} , algunos de los cuales son bloqueados por esta toxina con una constante de disociación en el rango nanomolar (Latorre y cols., 1989); cuarto, se evidencia la presencia de la conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} en los cilios olfatorios, la cual se diferencia de la conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} encontrada en el soma de la neurona olfatoria porque esta última es insensible a CTX (figura 28, ver sección 8). Evidencias recientes obtenidas usando la técnica de incorporación de vesículas en bicapas planas de fosfolípidos, han confirmado que los cilios olfatorios de *C. caudiverbera*, poseen canales de K^+ activado por Ca^{2+} de alta conductancia (Jorquera y cols., 1995). Este canal presentó una sensibilidad a CTX similar a la mostrada por la conductancia gatillada por odorantes y a la presentada por otros canales de K^+ activado por Ca^{2+} de alta conductancia (Latorre y cols., 1989). Las evidencias sugieren que la neurona olfatoria de vertebrado presenta una distribución diferencial de canales de K^+ activados por Ca^{2+} ; en el soma se localizarían aquellos que son insensibles a CTX y en los cilios olfatorios estarían ubicados aquellos que son sensibles a esta toxina, siendo estos últimos los que participan en la transducción de los odorantes que forman la mezcla II.

La participación de canales de K^+ sensibles a CTX ha sido sugerida en neuronas olfatorias de pez gato. Miyamoto y colaboradores (1992b) informaron que la despolarización transitoria inducida por IP_3 , en presencia de CTX externo es de naturaleza mantenida. Esto sugiere que un canal de K^+ activado por Ca^{2+} sensible a CTX está involucrado en la fase de repolarización de la respuesta inducida por IP_3 . Cabe

recordar que estos autores han postulado al IP_3 como el mensajero secundario en la respuesta excitatoria en el pez gato. En este trabajo de Tesis se demuestra claramente que en el sapo una conductancia ciliar de K^+ sensible a CTX, participa en la transducción de los odorantes de la mezcla II generando un potencial de receptor hiperpolarizante. Sin embargo, no se descarta la posibilidad que en algunas neuronas ésta conductancia pueda ser relevante además en la modulación del potencial de receptor excitatorio. Hay que recordar que los odorantes excitatorios inducen un aumento del Ca^{2+} intracelular ingresando a la célula por el canal sensible a nucleótidos cíclicos (Zufall y cols., 1994). Más aún, en invertebrados, las post-hiperpolarizaciones prolongadas observadas en neuronas de langosta marina, han sido atribuidas a una conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} (Anderson y Ache, 1985).

3.1. Importancia fisiológica de la corriente de K^+ inducida por odorantes.

La importancia fisiológica de la corriente de K^+ inducida por odorantes en el fenómeno inhibitorio, se demostró examinando el efecto de pulsos de corriente hiperpolarizantes sobre la actividad espontánea de potenciales de acción. Se encontró que las corrientes (-1 ó -2 pA) necesarias para inducir una hiperpolarización y un efecto inhibitorio fueron similares a la inducida por los odorantes, sugiriendo que la corriente gatillada por la mezcla II se ajusta a una función inhibitoria.

3.2. Sitio de la quimiotransducción.

Estudios bioquímicos y electrofisiológicos han demostrado que la sensibilidad de las neuronas olfatorias a odorantes que activan la cascada del AMPc (mezcla I) está restringida a la región ciliar de las células (Kurahashi, 1989 y 1990; Lowe y Gold, 1991; Firestein y cols. 1991a, Sklar y cols., 1986). En esta Tesis, tres observaciones sugieren que la respuesta inducida por los odorantes que no activan esta cascada (mezcla II) también está confinada a esta región de la célula. Primero, sólo aquellos pulsos que alcanzan los cilios olfatorios indujeron corrientes iónicas activadas por odorantes. Segundo, la distribución de la conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} sensible a CTX, que participa en la transducción de estos odorantes, se encuentra en los cilios olfatorios (Morales y cols., 1995). Tercero, en experimento de imágenes de Ca^{2+} realizados en neuronas aisladas de sapo (Bacigalupo y cols., 1995), se observó que los odorantes de la mezcla II inducen un aumento de Ca^{2+} en la región apical de la célula (figura 34).

4. Mecanismo de quimiotransducción de los odorantes inhibitorios.

4.1. Función del calcio.

En neuronas olfatorias, el Ca^{2+} , además de participar en la generación de la corriente de transducción excitatoria, también está involucrado en el fenómeno de la

adaptación, disminuyendo la afinidad del canal por los nucleótidos cíclicos a través de la calmodulina (Kurahashi y Shibuya, 1990; Kramer y Sielgelbaum, 1992; Liu y cols., 1994; Chen y Yau, 1994) y bloqueando de una manera dependiente del potencial el canal activado por nucleótidos cíclicos (Zufall y cols., 1991b; Zufall y cols., 1994).

El descubrimiento de la participación de una conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} en la generación de la respuesta inhibitoria sugirió que el Ca^{2+} también es un intermediario en el mecanismo de transducción asociado a odorantes de la mezcla II. La respuesta inducida por estos olores fue abolida completamente al removerse el Ca^{2+} del medio externo, demostrando que este catión participa en la generación de la respuesta inhibitoria y que el origen de este Ca^{2+} es principalmente extracelular. Esto último se confirmó al encontrar que la nifedipina bloqueó reversiblemente la corriente de salida y el potencial de receptor inhibitorio. Es importante señalar, que la aplicación de nifedipina sobre la cara citoplasmática de un parche escindido de neurona olfatoria aislada de salamandra, también bloqueó reversiblemente el canal activado por nucleótidos (Zufall y cols., 1991c). Por lo tanto, experimentos futuros son necesarios para elucidar este punto.

Otra evidencia de la participación del Ca^{2+} en la respuesta inhibitoria, provino de estudios de imágenes de Ca^{2+} con microscopía confocal, usando Fluo-3AM como indicador de Ca^{2+} , en neuronas olfatorias aisladas (Bacigalupo y cols., 1995). Se observó que 8 de 19 (42%) células estimuladas con odorantes de la mezcla II respondieron con un aumento del Ca^{2+} intracelular en región apical (figura 34). El porcentaje de células que mostraron este aumento fue similar al de las células que

responden electrofisiológicamente a un estímulo similar (Madrid y Morales, 1995). Este aumento en los niveles de Ca^{2+} inducido por los odorantes inhibitorio fue bloqueado por la misma concentración de nifedipina utilizada en los experimentos electrofisiológicos (Madrid y Morales, 1995). Mediciones de los niveles de Ca^{2+} intracelulares han sido realizadas en neuronas olfatorias de otras especies. Restrepo y colaboradores (1993b) midieron los niveles de Ca^{2+} utilizando Fura-2 como indicador de este ion en neuronas olfatorias de rata. Ellos utilizaron dos mezclas de odorantes de composición similar a las utilizadas en esta Tesis: una compuesta por odorantes que estimulan la producción de AMPc y la otra con odorantes que no activan la adenilil ciclasa. Encontraron que ambas mezclas de odorantes elevaron el Ca^{2+} en el lumen del botón dendrítico en una fracción de las neuronas examinadas. Ellos no pudieron encontrar diferencias con respecto a la distribución espacial de los cambios de Ca^{2+} inducidos por ambos estímulos químicos. Por otro lado, se ha encontrado que las neuronas olfatorias aisladas del pez gato responden con un aumento del Ca^{2+} intracelular al estimularlas con L-aminoácidos (Restrepo y cols., 1990; Restrepo y Boyle, 1991).

Las evidencias presentadas demuestran, por una parte, que el Ca^{2+} es un intermediario en la transducción de odorantes de la mezcla II y por otra, que el Ca^{2+} externo es necesario para producir la respuesta dependiente de odorantes. Además sugirieron la participación de un canal de Ca^{2+} en el mecanismo de transducción de los odorantes pútridos de la mezcla II. En siete células de un total de 48, perfundidas en solución Ringer con 10 mM Ba^{2+} , fue posible detectar esta corriente de entrada de Ba^{2+} al ser estimuladas con la mezcla II, sugiriendo que estos odorantes activan una

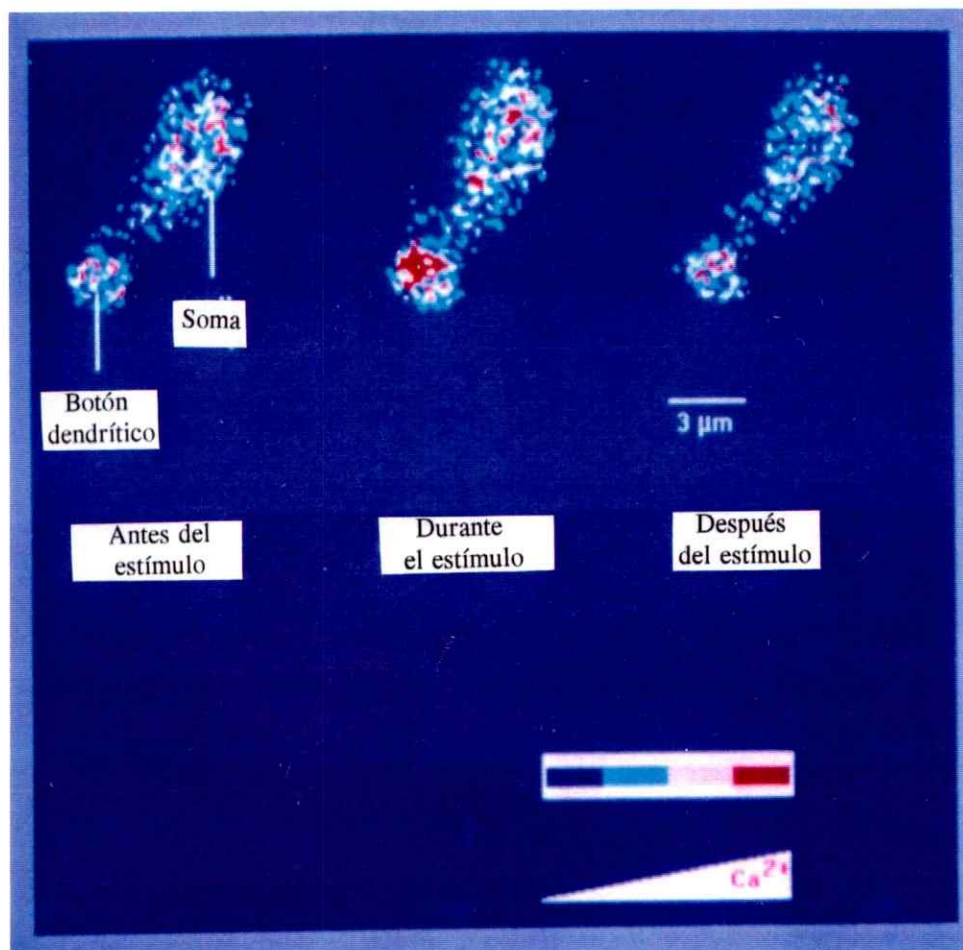


Figura 34. Aumento del Ca^{2+} en la región apical de neuronas olfatorias inducido por la mezcla II. La figura muestra imágenes en pseudocolores obtenidas en un microscopio confocal, de una neurona olfatoria. Las células fueron cargadas previamente con el indicador de Ca^{2+} Fluo3-AM. Se puede apreciar que 100 μM de la mezcla II aplicada durante 4 s, indujo un aumento transitorio en la fluorescencia (color rojo) principalmente en el botón dendrítico (gentileza de Rodolfo Madrid y Juan Bacigalupo).

conductancia de Ca^{2+} . Esta corriente se registró bajo estas condiciones iónicas para aumentar su magnitud, ya que el canal de Ca^{2+} es más permeable al Ba^{2+} que al Ca^{2+} .

Previamente se han descrito corrientes de Ca^{2+} inducidas por odorantes en otras especies. Las neuronas olfatorias aisladas de pez gato generan una corriente de entrada de Ca^{2+} al ser estimuladas con L-aminoácidos (Restrepo y cols., 1990; Miyamoto y cols., 1992a). Aunque tiene una cinética parecida a la corriente de Ba^{2+} descrita aquí, la magnitud de la corriente es 10 veces mayor. En langosta marina, Fadool y Ache (1992) encontraron que una mezcla de L-aminoácidos inducen una corriente de entrada de características similares a la corriente de Ba^{2+} observada en esta Tesis. Esta corriente es aumentada al dializar la célula con IP_3 y es inhibida por rojo de rutenio (Fadool y Ache, 1992). Sobre la base de estos resultados Ache (1994) sugiere que el mecanismo de transducción de los odorantes excitatorios en neuronas olfatorias de langosta, es compatible con la activación de una corriente de entrada de Ca^{2+} .

En el mecanismo de transducción de los odorantes de la mezcla II la función del Ca^{2+} está recién comenzando a ser conocida. Las evidencias presentadas aquí son la primera indicación de esto y sugieren que el aumento del Ca^{2+} citosólico activaría una conductancia de K^+ activada por Ca^{2+} , que generaría el potencial de receptor hiperpolarizante. Para que ocurra este aumento de Ca^{2+} se requiere previamente la activación de una conductancia de Ca^{2+} por un mensajero secundario de naturaleza aún desconocida.

4.2. Inositol 1,4,5-trisfosfato.

En estudios de cinética rápida realizados en preparaciones de cilios olfatorios de rata, Breer y colaboradores (1990) encontraron que los odorantes que no tenían efecto sobre la adenilil ciclase en los estudios de Sklar y cols. (1986) y Pace y cols. (1985), activaban la producción de IP_3 , mientras que aquellos que sí activaban la adenilil ciclase no alteraban los niveles de IP_3 . Estos resultados han llevado a postular la existencia de dos vías diferentes de quimiotransducción, una que opera para odorantes que activan el AMPc y otra que opera para odorantes que activan el IP_3 . Entre los odorantes que elevaron los niveles de IP_3 , se encuentran los utilizados en esta Tesis para formar la mezcla que indujeron un efecto inhibitorio (mezcla II). En tanto, entre los que estimularon la adenilil ciclase se encuentran los utilizados para formar la mezcla que indujo un efecto excitatorio en neuronas olfatorias (mezcla I).

El considerable retardo ($>$ de 200 ms) observado en el desarrollo de la corriente inhibitoria después de aplicada la mezcla II, más el hecho de la existencia de una conductancia de Ca^{2+} sensible a odorantes, es consistente con la idea que estos olores activan una cascada enzimática. A pesar que en esta Tesis no se realizaron experimentos electrofisiológicos dirigidos a conocer la naturaleza de este mensajero, evidencias bioquímicas han demostrado que estos odorantes elevan los niveles de IP_3 en preparaciones de cilios olfatorios de rata (Breer y Boekhoff, 1991) y en pez gato (Restrepo y cols., 1993a). El conjunto de estas evidencias sugieren que en el mecanismo de quimiotransducción inhibitorio participa el IP_3 como mensajero secundario,

posiblemente a través de la activación de una conductancia de Ca^{2+} en la membrana de los cilios olfatorios.

La función del IP_3 ha sido asociada clásicamente a la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares por su acción sobre el receptor a IP_3 (para revisión, ver Ferris and Snyder, 1992). Hoy día es aceptado que el IP_3 también produce aumento del Ca^{2+} citosólico por la activación de conductancias de Ca^{2+} localizadas en la membrana plasmática. Tal es el caso en linfocitos (Khan y cols., 1992) y en células cebadas (Penner y cols., 1988). En neuronas olfatorias también ha sido postulada la acción del IP_3 sobre conductancias localizadas en la membrana plasmática. Experimentos de inmunoreactividad usando anticuerpos contra el receptor a IP_3 de cerebelo, han demostrado la presencia de estos receptores en cilios olfatorios de rata (Cunningham y cols., 1993). Por otro lado, en neuronas olfatorias de pez gato también se ha observado la acción del IP_3 . En canales provenientes de cilios olfatorios de pez gato e incorporados en bicapas de fosfolípidos formada en la punta de una pipeta de *patch clamp*, el IP_3 activó una conductancia unitaria de 80 pS (Restrepo y cols., 1990). Más aún, al dializar estas células con IP_3 contenido en la pipeta de registro, las neuronas olfatorias desarrollaron una despolarización transitoria del potencial de membrana (Restrepo y cols., 1990). A diferencia de lo que se postula en esta Tesis, que el IP_3 estaría involucrado en la repuesta inhibitoria, en el pez gato el IP_3 mediaría una repuesta excitatoria, activando directamente una conductancia de Ca^{2+} que por sí sola tendría un efecto excitatorio. Una repuesta similar a la inducida por IP_3 fue encontrada por Miyamoto y colaboradores (1992b), al dializar la neurona olfatoria del pez gato con

AMPC. Ellos proponen que ambas son excitatorias pero resultan de la activación de conductancias distintas, ya que ambas respuestas presentan una farmacología diferente (la corriente activada por IP_3 es sensible a rojo de rutenio, no así la corriente activada por AMPC). Esta hipótesis se complica por evidencias recientes obtenidas por Kang y Caprio (1995) provenientes de experimentos *in vivo* realizados en pez gato. Estos autores encuentran que las neuronas olfatorias responden con una inhibición de la actividad eléctrica al estimularlas con el aminoácido alanina, aminoácido que produce un incremento en los niveles de IP_3 en preparación de cilios olfatorios de esta misma especie (Bruch y cols., 1987). De cualquier modo, las evidencias sugieren fuertemente que las neuronas olfatorias de vertebrados presentan múltiples mecanismos de quimiotransducción en concordancia con lo que se postula en esta Tesis.

No hay evidencias electrofisiológicas sobre la participación del IP_3 en la transducción de odorantes en anfibios. La diálisis de neuronas olfatorias de salamandra con este mensajero no produjo ningún efecto en su actividad eléctrica (Firestein y cols., 1991a). Lowe y Gold (1993) utilizando IP_3 enjaulado en neuronas de rana bajo condiciones de potencial controlado con un V_{mant} de -70 mV, tampoco obtuvieron respuesta. Si el IP_3 activara directamente una conductancia de Ca^{2+} en estos estudios, la corriente requerida para elevar la concentración de Ca^{2+} a 46 μM en los cilios olfatorios sería de 0.1 pA, magnitud que difícilmente podría ser detectada bajo las condiciones experimentales utilizadas por estos investigadores. Por otro lado, de acuerdo al modelo que se postula en esta Tesis (ver más abajo), el aumento de Ca^{2+} activa una conductancia de K^+ . No es de extrañar que Lowe y Gold no hayan observado un efecto

de este mensajero, por cuanto una corriente de K^+ sería también muy pequeña al potencial que ellos utilizaron. Lowe y Gold no investigaron el efecto de IP_3 a potenciales distintos de -70 mV (G. Gold, comunicación personal).

Los resultados obtenidos en invertebrados son mejor entendidos que en vertebrados. En la langosta marina, el grupo de Ache demostró claramente la presencia de dos mecanismos de quimiotransducción, uno mediado por IP_3 y otro mediado por AMPc y, al igual que las neuronas olfatorias del sapo, ambos mecanismos pueden coexistir en una misma célula (McClintock y Ache, 1989; Michel y cols., 1991; Fadool y cols., 1993; Michel y Ache, 1994; ver revisión ver Ache, 1994). Ellos también encontraron que estos mecanismos están asociados a respuestas inhibitorias y excitatorias inducidas por aminoácidos. Pero, a diferencia de lo observado en vertebrados, la respuesta inhibitoria en langosta es generada por una conductancia de K^+ activada por AMPc, mientras que la respuesta excitatoria lo es por una conductancia catiónica inespecífica inducida por IP_3 .

4.3. Un modelo del mecanismo de transducción de odorantes inhibitorios en neuronas de *Caudiverbera caudiverbera*.

Los resultados presentados en esta Tesis, permiten proponer el siguiente mecanismo de transducción para odorantes de la mezcla II. La unión de odorantes a receptores proteicos localizados en la membrana de los cilios olfatorios (Raminig y

cols., 1993) activaría una cascada enzimática en la que participaría el IP_3 como mensajero secundario (Breer y cols., 1990; Boekhoff y cols., 1990; ver Breer y Boekhoff, 1992). El aumento en los niveles de IP_3 ocurriría por la activación de una fosfolipasa C, vía proteína G. Esta proteína G sería diferente a G_{olf} , posiblemente G_o o G_i (Boekhoff y cols., 1990; Cunningham y cols., 1993). Estas proteínas han sido encontrada en gran cantidad en cilios olfatorios del sapo chileno (Schmidt y Monasterio, 1990) y en otras neuronas olfatorias (Jones, 1990, Jones y cols., 1990). El aumento del IP_3 activaría una conductancia de Ca^{2+} localizada en la membrana de los cilios olfatorios (esta Tesis; Restrepo y cols., 1990; Miyamoto y cols., 1992b), incrementando así el Ca^{2+} en la región apical de la célula quimiosensorial. Este aumento de Ca^{2+} permitiría la activación de un canal de K^+ activado por Ca^{2+} (esta Tesis; Jorquera y cols., 1995), el cual produciría el potencial de receptor hiperpolarizante que inhibe la descarga de potenciales de acción observada al estimular las neuronas olfatorias con odorantes de la mezcla II (esta Tesis). Un esquema de este mecanismo de quimiotransducción se muestra en la figura 35.

Las bases moleculares de la quimiotransducción olfativa ha sido abordada por los investigadores a través de diferentes metodologías. En esta Tesis, haciendo uso de la preparación de neuronas olfatorias aisladas y de la técnica de *patch clamp*, ha sido posible identificar un nuevo mecanismo de transducción para las neuronas olfatorias de vertebrados. Aunque no fue posible alcanzar una caracterización acabada de la cascada bioquímica involucrada en este mecanismo de transducción, se sentaron las bases para que en futuras investigaciones se llegue a la caracterización molecular de los

intermediarios que participan en este proceso. Como se mencionó anteriormente, hasta hace poco los esfuerzos para el entendimiento de la percepción olfativa estaban dirigidos exclusivamente al estudio del efecto excitatorio. Después de esta Tesis se hace necesario ampliar estos estudios al fenómeno inhibitorio.

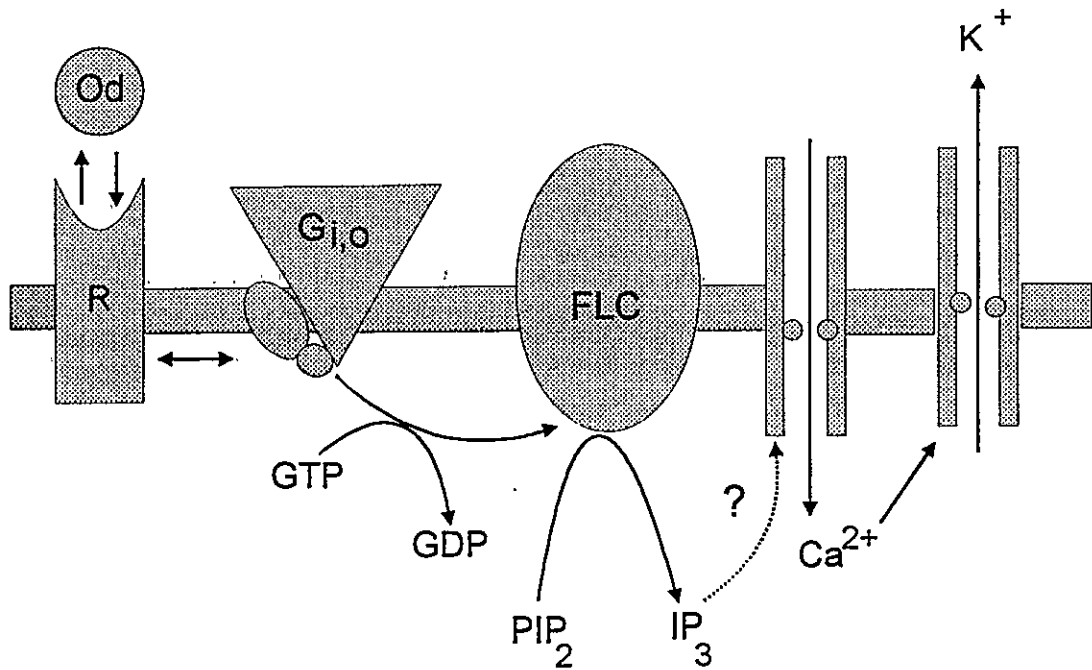


Figura 35. Modelo del mecanismo que podría operar en la quimiotransducción de los odorantes de la mezcla II, cuya principal característica es que aumentan los niveles de IP₃ en preparaciones de cilios olfatorios de vertebrados. En este esquema O representa las moléculas de odorante, R el receptor a odorantes, G_{i,o} proteínas G_i o G_o y FLC a la fosfolipasa C.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ache, B. 1994. Towards a common strategy for transducing olfactory information. *Cell Biology*. 5: 55-63.
- Akers, R.P. 1992. A test of identified response classes among olfactory receptor neurons in the honey-bee worker. *Chem. Senses*. 17: 191-209.
- Anderson, P.A. y Ache, B. 1985. Voltage- and current-clamp recordings of the receptor potential in olfactory receptor cells *in situ*. *Brain Res*. 338: 273-280.
- Anholt, R.R.H., Aebi, U. y Snyder, S. 1986. A partially purified preparation of isolated chemosensory cilia from the olfactory epithelium of the bullfrog, *Rana catesbiana*. *J. Neurosci*. 6: 1962-1969.
- Bacigalupo, J., Morales, B., Labarca, P. y Madrid, R. 1995. Involvement of Ca²⁺-activated K⁺ channel in odorant-triggered inhibitory responses of toad olfactory neurons. *Chem. Senses*. Resumen. En prensa.
- Baylín, F. 1979. Temporal patterns and selectivity in the unitary responses of olfactory receptors in the tiger salamander to odor stimulation. *J. Gen. Physiol*. 74: 17-36.
- Boekhoff, I. y Tareilus, E., Strotmann, J. y Breer, H. 1990. Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *EMBO J*. 9: 2453-2458.
- Boekhoff, I. y Breer, H. 1990. Differential stimulation of second messenger pathways by distinct classes of odorants. *Neurochem. Intl*. 7 (4): 553-557.

- Breer, H. Boekhoff, I. y Tareilus, E. 1990. Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature* 345: 65-68.
- Breer, H. y Boekhoff, I. 1991. Odorants of the same odor class activate different second messenger pathways. *Chem. Senses*. 16: 19-29.
- Breer, H. y Boekhoff, I. 1992. Second messenger signalling in olfaction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 439-443.
- Boekhoff, I. y Breer, H. 1992. Termination of second messenger signaling in olfaction. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 89: 471-474.
- Bruch, R., Mulli, R. y Boyle, A. 1987. Olfactory L-amino acid receptor specificity and stimulation of potential second messenger. *Chem. Senses*. 12: 642-643.
- Bruch, R., Kalinoski, D. y Kare, M. 1988. Biochemistry of vertebrate olfaction and taste. *Annu. Rev. Nutr.* 8: 21-42.
- Bruch, R.C. y Teeter, J.H. 1989. Second-messenger signalling mechanisms in olfaction. Cap. 14. In: *Chemical Senses*. Vol. 1: Receptor events and transduction in Taste and olfaction. (Ed. Brand, J.G., Cagan, R.H., Teeter, J. H. y Kare, M.R.). pp. 283-298. Marcel Dekker Inc., New York.
- Buck, L. y Axel, R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odorant recognition. *Cell*. 65: 175-187.
- Caprio, J. y Byrd, R. 1984. Electrophysiological evidence for acidic, basic and neural amino acid olfactory receptor sites in the catfish. *J. Gen. Physiol.* 84: 403-422.
- Chen, T-Y. y Yau, K-W. 1994. Direct modulation by Ca^{2+} -calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons. *Nature*. 368: 545-548.

Cunningham, A., Ryugo, D., Sharp, A., Reed, R., Snyder, S. y Ronnett, G. 1993. Neuronal inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to the plasma membrane of olfactory cilia. *Neuroscience*. **57**: 339-352.

Delgado, R. y Labarca, P. 1993. Properties of whole-cell currents in isolated olfactory neurons from the Chilean toad *Caudiverbera caudiverbera*. *Am. J. Physiol.* **264**: C1418-C1427.

Dhallan, R.S., Yau, K.-W., Schrader, K.A. y Reed, R.R. 1990. Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* **347**: 184-187.

Dionne, V.E. 1992. Chemosensory responses in isolated olfactory receptor neurons from *Necturus maculosus*. *J. Gen. Physiol.* **99**: 415-433.

Dubin, A. y Dionne, V. 1993. Modulation de Cl^- , K^+ , and nonselective cation conductances by taurine in olfactory receptor neurons of the mudpuppy *Necturus maculosus*. *J. Gen. Physiol.* **101**: 469-485.

Dubin, A. y Dionne, V. 1994. Action potentials and chemosensitive conductances in the dendrites of olfactory neurons suggest new features for odor transduction. *J. Gen. Physiol.* **103**: 181-201.

Duchamp, A., Revial, M.F., Holley, A. y MacLeod, P. 1974. Odor discrimination by frog olfactory receptors. *Chem. Senses Flavour*. **1**: 213-233.

Fadool, D. y Ache, B. 1992. Plasma membrane inositol 1,4,5-trisphosphate-activated channels mediate signal transduction in lobster olfactory receptor neurons. *Neuron*. **9**: 907-918.

Fadool, D., Michel, W. y Ache, B. 1993. Odor sensitivity of cultured lobster olfactory

receptor neurons is not dependent on process formation. *J. Exp. Biol.* 174: 215-233.

Fenwick, E.M., Marty, A. and Neher, E. 1982. A patch clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J. Physiol.* (Lond.) 331: 577-797.

Ferris, C.D. y Snyder, S.H. 1992. Inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 469-488.

Firestein, S., Darrow, B. and Shepherd, G.M. 1991a. Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G-protein mediated cAMP second messenger system. *Neuron.* 6: 825-835.

Firestein, S., Shepherd, G.M. y Werblin, F.S. 1990. Time course of the membrane current underlying sensory transduction in salamander olfactory receptor neurones. *J. Physiol.* (London) 430: 135-158.

Firestein, S. y Werblin, F. 1987. Gated currents in isolated olfactory receptor neurons of the larval tiger salamander. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 6292-6296.

Firestein, S. and Werblin, F. 1989. Odor-induced membrane currents in vertebrate olfactory receptor neurons. *Science.* 244: 79-82.

Firestein, S., Zufall, F. y Shepherd, G.M. 1991b. Single odor-sensitive channels in olfactory receptor neurons are also gated by cyclic nucleotides. *J. Neurosci.* 11: 3565-3572.

Frings, S. and Lindemann, B., 1988. Odorant response of isolated olfactory receptor cells is blocked by amiloride. *J. Memb. Biol.* 105: 233-243.

Frings, S. and Lindemann, B., 1991. Current recording from sensory cilia of olfactory

receptor cells in situ. The neuronal response to cyclic nucleotides. *J. Gen. Physiol.* **97**: 1-16.

Gesteland, R.C., Lettvin, J.Y., Pitts, W.H. 1965. Chemical transmission in the nose of the frog. *J. Physiol.* (London) **181**: 525-559.

Getchell, T.V. 1986. Functional properties of vertebrate olfactory neurons. *Physiol. Rev.* **66**: 772-818.

Getchell, T.V. y Shepherd G.M. 1978a. Response of olfactory receptor cells to step pulses of odor at different concentrations in the salamander. *J. Physiol.* (London) **282**: 521-540.

Getchell, T.V. y Shepherd, G.M. 1978b. Adaptive properties of olfactory receptors analyzed with odor pulses of varying durations. *J. Physiol.* (London) **282**: 541-560.

Goulding, E.H., Ngai, J., Kramer, R.H., Colicos, S., Axel, R., Siegelbaum, S.A. y Chess, A. 1992. Molecular cloning and single-channel properties of the cyclic nucleotide-gated channel from the catfish olfactory neurons. *Neuron* **8**: 45-58.

Hamill, O.P., Marty, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch.* **391**: 85-100.

Hille, B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. *Sunderland, Massachusetts, USA.*

Holley, A., Duchamp, A., Revial, M., Juge, A. y MacLeod, P. 1974. Qualitative and quantitative discrimination in the frog olfactory receptors: analysis from electrophysiological data. *Ann. NY Acad. Sci.* **237**: 102-114.

- Holley, A. y Sicard, G. 1984. Receptor cell responses to odorants: similarities and differences among odorants. *Brain Res.* **292**: 283-296.
- Huque, T. y Bruch, R.C. 1986. Odorant- and guanine nucleotide phosphoinositide turnover in olfactory cilia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**: 36-42.
- Ivanova, T. y Caprio, J. 1993. Odorant receptor activated by amino acids in sensory neurons of the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. Gen. Physiol.* **102**: 1085-1105.
- Jones, D.T. y Reed, R.R. 1989. G_{olf}: An olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science.* **244**: 790-795.
- Jones, D.T. 1990. Distribution of the stimulatory GTP-binding protein, G_s and G_{olf}, within olfactory neuroepithelium. *Chem. Senses.* **15**: 333-340.
- Jones, D.T., Masters, S., Bourne, H. and Reed, R. 1990. Biochemical characteristics of three stimulatory GTP binding proteins: the large and small forms of G_s and the olfactory specific G protein, G_{olf}. *J. Biol. Chem.* **265**: 2671-2676.
- Jorquera, O., Latorre, R. y Labarca, P. 1995. Ion channel classes in the ciliary membrane of olfactory neurons: *Planar lipid bilayer studies*. *Am. J. Physiol.* In press.
- Kang, J. y Caprio, J. 1995. In vivo responses of single olfactory receptor neurons in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Neurophysiol.* **73**: 172-177.
- Khan, A., Steiner, J. y Snyder, S.H. 1992. Plasma membrane inositol 1,4,5-trisphosphate receptor of lymphocytes: selective enrichment in sialic acid and unique binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 2849-2853.
- Kleene, S. y Gesteland, R. 1991. Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J. Neurosci.* **11**: 3624-3629.

- Kramer, R.H. y Siegelbaum, S.A., 1992. Intracellular Ca^{2+} regulates the sensitivity of cyclic nucleotide-gated channels in olfactory receptor neurons. *Neuron*. **9**: 897-906.
- Kurahashi, T. 1989. Activation by odorants of cation-selective conductance in the olfactory receptor cell isolated from the newt. *J. Physiol.* (London) **419**: 177-192.
- Kurahashi, T. 1990. The response induced by intracellular cyclic AMP in isolated olfactory receptor cells of the newt. *J. Physiol.* (London) **430**: 355-371.
- Kurahashi, T. y Shibuya, T. 1990. Ca^{2+} -dependent adaptive properties in the solitary olfactory receptor cell of the newt. *Brain Res.* **515**: 261-268.
- Kurahashi, T. y Yau K-W. 1993. Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature*. **363**: 71-74.
- Kurihara, K. y Koyama, N. 1972. High activity of adenyl cyclase in olfactory and gustatory organs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**: 30-35.
- Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P. y Alvarez, O. 1989. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* **51**: 385-399.
- Labarca P. y Bacigalupo, J. 1988. Ion channels from chemosensory olfactory neurons. *J. Bioenerg. Biomemb.* **20** (5): 551-569.
- Lancet, D. 1986. Vertebrate olfactory reception. *Annu. Rev. Neurosci.* **9**: 329-355.
- Liu, M., Chen, T-Y., Hamed, B., Li, J. y Yau, K-W. 1994. Calcium-calmodulin modulation of the olfactory cyclic nucleotide-gate cation channel. *Science*. **266**: 1348-1354.
- Lowe, G. y Gold, G.H. 1991. The spatial distribution of odorant sensitivity and

odorant-induced currents in salamander olfactory receptor cells. *J. Physiol. (London)* **442**: 147-168.

Lowe, G. y Gold, G. 1993. Contribution of the ciliary cyclic nucleotide-gated conductance to olfactory transduction in the salamander. *J. Physiol. (London)* **462**: 175-196.

Lucero, M., Horrigan, F. y Gilly, W. 1992. Electrical responses to chemical stimulation of squid olfactory receptor cells. *J. Exp. Biol.* **162**: 231-249.

Ludwig, J., Marglit, T., Eismann, E., Lancet, D. y Kaupp, U.B. 1990. Primary structure of a cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett.* **270**: 24-29.

Madrid, R. y Morales, B. 1995. Participación del Ca^{2+} externo en la respuesta inhibitoria inducida por odorantes en neuronas olfatorias de vertebrado. *Revista Médica*. En prensa.

Mathews, D.F. 1972. Response patterns of single neurons in the tortoise olfactory epithelium and olfactory bulb. *J. Gen. Physiol.* **60**: 166-180.

Maue, R. y Dionne, V. 1987. Patch-clamp studies of isolated mouse olfactory receptor neurons. *J. Gen. Physiol.* **90**: 95-125.

McClintock, T.S. and Ache, B.W. 1989. Hyperpolarizing receptor potentials in lobster olfactory receptor cells: implications for transduction and mixture suppression. *Chem. Senses.* **14**: 637-647.

Menevse, A., Dodd, G. y Poynder, T. 1977. Evidence for the specific involvement of cyclic AMP in the olfactory transduction mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**: 671-676.

Michel, W. y Ache, B. 1994. Odor-evoked inhibition in primary olfactory receptor neurons. *Chem. Senses*. **19**: 11-24.

Michel, W., McClintock, T. y Ache, B. 1991. Inhibition of lobster olfactory receptor cell by an odor-activated potassium conductance. *J. Neurophysiol.* **65**: 446-453.

Miyamoto, T., Restrepo, D. y Teeter, J.H. 1992a. Voltage-dependent and odorant-regulated currents in isolated olfactory receptor neurons of the channel catfish. *J. Gen. Physiol.* **99**: 505-530.

Miyamoto, T., Restrepo, D., Cragoe, E. y Teeter, J.H. 1992b. IP₃ and cAMP-induced responses in isolated olfactory receptor neurons from the channel catfish. *J. Memb. Biol.* **127**: 173-183.

Morales, B. y Ugarte, G. 1989. Electrophysiological studies in isolated olfactory neurons. *Arch. Biol. Med. Exp.* **22**: R-279.

Morales, B., Montesino, H., Labarca, P. y Bacigalupo, J. 1990. Effect of odorants on the electrical response of isolated vertebrate olfactory neurons. *2do. Congreso Biofísica del Cono Sur.* pp. 42.

Morales, B., Ugarte, G., Labarca, P. y Bacigalupo, J. 1994. Estudio de la adaptación en neuronas olfatorias de vertebrados. *Asoc. Lat-Amer. Cs. Fisiol.* R-426.

Morales, B., Ugarte, G., Labarca, P. y Bacigalupo, J. 1994. Inhibitory K⁺ currents activated by odorants in toad olfactory neurons. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **257**: 235-242.

Morales, B., Labarca, P. y Bacigalupo, J. 1995. A ciliary conductance sensitive to charybdotoxin underlies inhibitory responses in toad olfactory receptor neurons. *FEBS lett.* **359**: 41-44.

Nakamura, T. y Gold, G.H. 1987. A cyclic-nucleotide gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature*. **325**: 442-444.

Ngai, J., Dowling, M., Buck, L., Axel, R. y Chess A. 1993a. The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. *Cell*. **72**: 657-666.

Ngai, J., Chess, A., Dowling, M., Necles, N., Macagno, E. y Axel, R. 1993b. Coding of olfactory information: topography of odorant receptor expression in the catfish olfactory epithelium. *Cell*. **72**: 667-680.

O'Connell, R.J. y Mozell, M.M. 1969. Quantitative stimulation of frog olfactory receptors. *J. Neurophysiol.* **32**: 51-63.

Ottoson, D. 1956. Analysis of the electrical activity of the olfactory epithelium. *Acta Physiol. Scand.* **35** (Suppl. 122) 1-83.

Ottoson, D. 1958. Studies on the relationship between olfactory stimulating effectiveness and physico-chemical properties of odorous components. *Acta Physiol. Scand.* **43**: 167-181.

Pace, U., Hanski, E., Salomon, Y. y Lancet, D. 1985. Odorant sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature* **316**: 255-258.

Penner, R. Matthews, G. y Néher, E. 1988. Regulation of calcium influx by second messengers in rat mas cells. *Nature*. **334**: 499-504.

Pevsner, J., Hou, V., Snowman, A.M. y Solomon, H.S. 1990. Odorant-binding protein. Characterization of ligand binding. *J. Biol. Chem.* **265**: 6118-6125.

Raming, K., Krieger, J., Strotmann, J., Boekhoff, I., Kubick, S., Baumstark, C. y Breer, H. 1993. Cloning and expression of odorant receptors. *Nature*. **361**: 353-356.

Ressler, K., Sullivan, S. y Buck, L. 1993. A zonal organization de odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*. **73**: 597-609

Restrepo, D., Miyamoto, T., Bryant, B. y Teeter, J.H. 1990. Odor stimuli trigger influx of calcium into olfactory neurons of the channel catfish. *Science*. **249**: 1166-1168.

Restrepo, D. y Boyle, A. 1991. Stimulation of olfactory receptors alters regulation of $[Ca]_i$ in olfactory neurons of the catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Memb. Biol.* **120**: 223-232.

Restrepo, D., Boekhoff, I. and Breer, H. 1993a. Rapid kinetic measurements of second messenger formation in olfactory cilia from channel catfish. *Am. J. Physiol.* **264**: C906-C911.

Restrepo, D., Okoda, Y. y Teeter, J.H. 1993b. Odorant-regulated Ca^{2+} gradients in rat olfactory neurons. *J. Gen. Physiol.* **102**: 907-924.

Rhein, L.D. y Cagan, R.H. 1980. Biochemical studies of olfaction: isolation, characterization and odorant binding activity of cilia from rainbow trout olfactory rosettes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **77**: 4412-4416.

Rhein, L.D. y Cagan, R.H. 1983. Biochemical studies of olfaction: binding specificity of odorants to cilia preparation from rainbow trout olfactory rosettes. *J. Neurochem.* **41**: 569-577.

Reval, M.F., Duchamp, A. y Holley, A. 1978. Odour discrimination by frog olfactory receptors: a study. *Chem. Senses Flavour*. **3**: 7-21.

Schild, D. 1989. Whole-cell currents in olfactory receptor cells of *Xenopus laevis*. *Exp. Brain Res.* **78**: 223-232.

Schmidt, p. y Monasterio, O. 1990. Participación de la adenilato ciclasa de cilios quimiosensores de la rana chilena *Caudiverbera caudiverbera* en la quimiotransducción olfatoria. *2do. Congreso Biofísica del Cono Sur*. pp. 42.

Sklar, P.B., Anholt, R.R.H. y Snyder, S.H. 1986. The odorant sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells: differential stimulation by distinct classes of odorants. *J. Biol. Chem.* **261**: 15538-15543.

Trotier, D. 1986. A patch clamp analysis of membrane currents in salamander olfactory cells. *Pflügers Archiv.* **407**: 589-595.

Trotier, D. y MacLeod, P. 1983. Intracellular recordings from salamander olfactory receptor cells. *Brain Res.* **268**: 225-237.

Vassar, R., Ngai, J. and Axel, R. 1993. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell.* **74**: 309-318.

Zufall, F., Firestein, S. y Shepherd, G.M. 1991a. Analysis of single cyclic nucleotide-gated channels in olfactory receptor cells. *J. Neurosci.* **11**: 3573-3580.

Zufall, F., Shepherd, G.M. y Firestein, S. 1991b. Inhibition of the olfactory cyclic nucleotide gated ion channel by intracellular calcium. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **246**: 225-230.

Zufall, F. y Firestein, S. 1993. Divalent cations block the cyclic nucleotide-gated channel of olfactory receptor neurons. *J. Neurosci.* **69**: 1758-1768.

Zufall, F., Firestein, S. y Shepherd, M. 1994. Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**: 577-607.