

**Universidad de Chile**  
FACULTAD DE CIENCIAS

# **SUPRESIÓN POR OLORES DE LAS CORRIENTES DEPENDIENTES DEL POTENCIAL: POSIBLE PARTICIPACIÓN EN LA CODIFICACIÓN OLFATIVA**

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

Por

**Magdalena Sanhueza Tohá**

**Santiago, Diciembre de 2000**

Director de Tesis: Dr. Juan Bacigalupo Vicuña



..	1
<b>AGRADECIMIENTOS .</b>	<b>3</b>
<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN .</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN .</b>	<b>11</b>
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO .</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .</b>	<b>19</b>
<b>MATERIALES Y METODOS .</b>	<b>21</b>
<b>A. Disociación de las neuronas olfatorias. . .</b>	<b>21</b>
<b>B. Registros electrofisiológicos. . .</b>	<b>22</b>
<b>C. Sistema de estimulación. . .</b>	<b>23</b>
<b>D. Odorantes .</b>	<b>23</b>
<b>E. Determinación de la concentración de odorantes a nivel de la célula. . .</b>	<b>24</b>
<b>F. Soluciones. .</b>	<b>27</b>
<b>G. Análisis de los resultados. .</b>	<b>28</b>
<b>H. Lista de reactivos. .</b>	<b>28</b>
<b>1. Bloqueadores: .</b>	<b>28</b>
<b>2. Odorantes: .</b>	<b>28</b>
<b>3. Otros reactivos: . .</b>	<b>28</b>
<b>RESULTADOS . .</b>	<b>31</b>
<b>I MORFOLOGÍA Y PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS NEURONAS OLFATORIAS AISLADAS .</b>	<b>32</b>
<b>A. Características morfológicas de las neuronas olfatorias aisladas. . .</b>	<b>32</b>
<b>B. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas olfatorias. .</b>	<b>32</b>
<b>II DIVERSIDAD DE RESPUESTAS A LA ESTIMULACIÓN CON ODORANTES FLORALES Y FRUTALES . .</b>	<b>37</b>
<b>III SUPRESIÓN DE LAS CORRIENTES DEPENDIENTES DEL POTENCIAL POR</b>	<b>45</b>

<b>ODORANTES EN NEURONAS OLFATORIAS AISLADAS. . .</b>	
<b>A. Supresión de la corriente neta de salida (<math>I_o</math>) .</b>	<b>46</b>
<b>B. La supresión es independiente de la quimiotransducción. .</b>	<b>52</b>
<b>C. Las cuatro conductancias dependientes del potencial son suprimidas por pulsos breves de olor. . .</b>	<b>58</b>
<b>D. Supresión por olor en células no olfatorias. .</b>	<b>60</b>
<b>E. Significado fisiológico de la supresión. .</b>	<b>61</b>
<b>DISCUSIÓN .</b>	<b>67</b>
<b>Caracterización de la supresión por olor. .</b>	<b>68</b>
<b>El mecanismo de la supresión. .</b>	<b>70</b>
<b>Significado fisiológico de la supresión. .</b>	<b>72</b>
<b>REFERENCIAS .</b>	<b>75</b>

---

*A mi amiga de siempre, Carmen Julia, que estando yo perdida me invitó a descubrir el apasionante mundo de A. Luria.*



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a Juan Bacigalupo, por haberme acogido en su laboratorio siendo una principiante que nunca había visto una neurona y haberme ofrecido su confianza y la oportunidad de aprender. El apoyo permanente de Juan durante estos años ha sido absolutamente fundamental para la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Mario Luxoro por sus valiosos consejos y el apoyo que me brindó en cada una de las etapas del Doctorado.

Deseo también agradecer a Gonzalo Ugarte y Oliver Schmachtenberg por su ayuda en los experimentos con fotorreceptores y neuronas olfatorias de la rata, respectivamente.

Agradezco a Cecilia Vergara por su vitalidad y calidez; al Dr. Osvaldo Álvarez por su admirable claridad, por su afecto y por su música; a Ricardo Delgado por su serenidad y gran humanidad; a Danny Acevedo y Jeannette Bravo, por su gran voluntad y disposición.

A Rodolfo Madrid, Gonzalo Ugarte y Javier Díaz, compañeros de travesía, por el humor y complicidad cotidianos.

A Verónica Palma, por su amistad, afecto y optimismo a toda prueba.

A mis padres por su apoyo permanente e incondicional.

A Oliver, por su paciencia y cercanía.

A mi maravilloso hijo Daniel, por existir.

Este trabajo ha sido posible gracias al financiamiento obtenido de una Beca Fundación Puelma, de los Proyectos FONDECYT 1960878, 1990838, y del Instituto Milenio para Estudios Avanzados en Biología Molecular y Biotecnología.



---

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AMPc : Adenosina-3,5-monofosfato cíclico

°# #####

G# : gigaohms,  $10^{-3}$  ohms

Hz : Hertz

kHz : kilohertz,  $10^3$  Hz

M : Molar (moles/litro de solución)

mg : miligramos,  $10^{-3}$  gramos

ml : mililitros,  $10^{-3}$  litros

mM : milimolar,  $10^{-3}$  molar

ms : milisegundos,  $10^{-3}$  segundos

mV : milivolts,  $10^{-3}$  Volts

M# : megaohms,  $10^{-6}$  ohms

$\mu$ M : micromolar,  $10^{-6}$  Molar

$\mu$ m : micr#metros,  $10^{-6}$  metros

NO : neurona olfatoria

pA  $10^{-12}$  Amperes

psi : libras por pulgada cuadrada

s : segundos

TEA : tetraetilamonio

TTX : tetrodotoxina

V : Volts



---

## RESUMEN

Las neuronas receptoras del epitelio olfatorio (NOs) responden a los odorantes con cambios en la frecuencia de descarga de potenciales de acción. Las respuestas excitatorias consisten en aumentos en la frecuencia de descarga neuronal y resultan de la activación selectiva de una cascada de transducción dependiente de AMPc. El blanco electrofisiológico de esta cascada son dos conductancias iónicas ciliares de efecto despolarizante: una conductancia catiónica no selectiva activada directamente por AMPc y una conductancia de  $\text{Cl}^-$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otro lado, los odorantes pueden también inhibir la descarga debido a la generación de un potencial de receptor hiperpolarizante. Se ha propuesto que en esta respuesta inhibitoria participa una conductancia de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ; sin embargo, no se conocen los detalles del mecanismo de transducción involucrado.

Además de activar selectivamente la transducción en NOs disociadas, las moléculas odorantes inducen una supresión no selectiva de las conductancias iónicas. En esta Tesis se muestra que al estimular a las neuronas con pulsos de olor de duración y concentración similares a los necesarios para activar la transducción, es posible registrar una corriente asociada a la supresión de los canales dependientes del potencial. Esta *corriente de supresión* se suma a las corrientes de transducción en aquellas células que transducen los olores aplicados. Para obtener información respecto del mecanismo de la supresión se realizó una serie de experimentos en que se examinó la localización, latencia y selectividad del efecto. Los principales resultados de estos experimentos fueron: 1) al contrario que la transducción, la supresión es mayor cuando los olores se aplican localmente sobre el soma que sobre la región ciliar; 2) la latencia de la supresión es de unos 20 ms (un orden de magnitud menor que la de la transducción), lo que sugiere que se trataría de un efecto directo de los odorantes sobre los canales voltaje-dependientes, contrariamente a la transducción, que involucra una cascada enzimática; 3) todas las conductancias activadas por el potencial son suprimidas por pulsos de olor y el fenómeno se observa virtualmente en todas las neuronas estudiadas, conserven éstas sus cilios o no; la transducción, en cambio, se observa sólo en una fracción de las células y nunca en aquellas que han perdido sus cilios; 4) es posible generar supresión de las corrientes dependientes del potencial en neuronas no olfatorias, lo que prueba que se trata de un fenómeno independiente de la transducción olfativa. Este estudio permite concluir que supresión y transducción son fenómenos de diferente naturaleza, pero que ambos podrían afectar la fisiología de las NOs.

En neuronas disociadas que no respondían a los olores utilizados con una corriente de transducción, se observó que el efecto de supresión puede producir alteraciones en el potencial de membrana y la descarga neuronal. La posibilidad de que la supresión no selectiva participe realmente en la fisiología del olfato es discutida y se propone que este fenómeno podría jugar un papel en la codificación de la intensidad del estímulo o contribuir al término de la respuesta a olor.



## ABSTRACT

Olfactory receptor neurons (ORNs) respond to odorants with changes in action potential firing frequency. Excitatory responses – consisting in increases in firing rate- are due to the selective activation by odors of a cAMP-dependent transduction cascade. The electrophysiological target of this cascade are two depolarizing ciliary conductances: a non-selective cationic cyclic nucleotide-gated conductance and a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{Cl}^-$  conductance. In addition, odorants can also inhibit spiking by inducing a hyperpolarizing receptor potential. A  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  conductance has been proposed to underlie this odor-triggered inhibitory response, but little is known about the associated transduction mechanism.

In addition to selectively triggering transduction in ORNs, odor molecules induce nonselective suppression of ionic conductances. The present work shows that, under voltage-clamp, a current associated with suppression of voltage-gated currents can be observed in dissociated ORNs upon stimulation with odorant pulses of similar duration and concentration as those required to induce transduction. This *suppression current* adds itself to the regular odor-induced currents in neurons that transduce the applied stimuli. To investigate the mechanism of suppression, experiments of localization, latency and selectivity of the effect were conducted, with the following results: 1) suppression is more pronounced when odors are applied to the soma than to the cilia, opposite to transduction; 2) suppression latency is about 20 ms (one order of magnitude shorter than the transduction latency), suggesting that it is due to a direct effect of odorants on voltage-gated ion channels, in contrast to transduction, which involves a signaling cascade; 3) all four voltage-gated conductances are suppressed by odor pulses in almost every neuron, including those that lost their cilia during dissociation; transduction, in contrast, is observed in only a fraction of the cells and never in those missing their cilia; 4) suppression of voltage-gated currents can also be induced in non-olfactory neurons, demonstrating that its mechanism is independent of olfactory transduction. In conclusion, transduction and suppression are essentially different odor-induced phenomena, although both may affect ORNs physiology.

In non-transducing dissociated ORNs, suppression caused changes in membrane potential and affected neuronal spiking. The possibility that suppression actually participates in olfactory physiology is discussed and a potential role in stimulus intensity coding or a contribution to the end of the odor response are proposed.



# INTRODUCCIÓN

Las células receptoras del epitelio olfatorio tienen una estructura filogenéticamente muy conservada entre los vertebrados: son neuronas bipolares pequeñas, provistas de una única dendrita desde cuyo extremo apical - el botón dendrítico- emergen los cilios olfatorios. Los cilios están en contacto directo con los odorantes provenientes del medio ambiente y en ellos se inicia el proceso de transducción quimioeléctrica. La existencia de uniones estrechas entre las células epiteliales separa los medios iónicos extracelulares y permite que las condiciones iónicas en el espacio intersticial permanezcan estables (Graziadei y Graziadei, 1979). Este neuroepitelio está constituido, además de las neuronas olfatorias, por células sustentaculares y células basales. Parte importante del proceso de codificación de la información olfativa se realiza ya a nivel de las neuronas receptoras del epitelio olfatorio, cuyos axones conectan directamente con las células mitrales del bulbo olfatorio (Kandel y Cols., 2000).

Las neuronas olfatorias de diversas especies presentan actividad eléctrica espontánea en forma de descarga de potenciales de acción, la que puede ser regular, en estallidos de actividad o aparentemente aleatoria. En el sapo chileno *Caudiverbera caudiverbera*, alrededor del 90% de las neuronas olfatorias aisladas presentan actividad espontánea, aunque la frecuencia de descarga varía ampliamente de una célula a otra: de 0 a 150 potenciales de acción (PA) por minuto, con un promedio de unos 40 PA/min (Morales, 1995).

La unión de las moléculas odorantes a receptores específicos ubicados en la membrana ciliar y posiblemente también en el botón dendrítico, gatilla una serie de

eventos intracelulares que modulan la conductancia de membrana de las neuronas olfatorias, produciendo cambios en su excitabilidad. El potencial de receptor inducido por los odorantes produce alteraciones en la frecuencia de descarga de potenciales de acción que son conducidos hacia el sistema nervioso central a través del axón. Cada neurona olfativa responde sólo - y diferencialmente- a una fracción del espectro de odorantes, dependiendo de los receptores específicos que ésta posea (Buck, 1996).

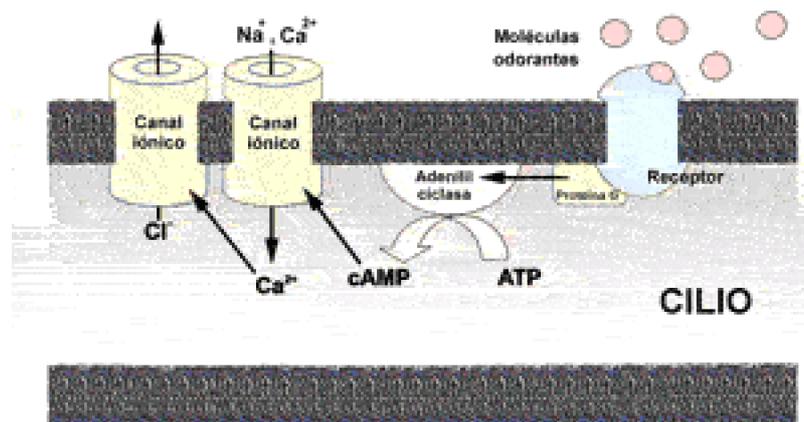
La información disponible hasta ahora indica que podría no existir un mecanismo único y universal para la transducción olfativa (Schild y Restrepo, 1998). Esta apreciación se basa principalmente en la observación de respuestas de tipo excitatorio e inhibitorio a la estimulación con olor (correspondientes a un aumento o disminución en la frecuencia de descarga, respectivamente). Se ha propuesto la existencia de diferentes vías de quimiotransducción, las que culminarían con la activación de distintas conductancias de membrana, dando lugar a respuestas fisiológicas diferentes (Morales y Bacigalupo, 1996). Alternativamente, una misma cascada intracelular podría divergir en sus etapas finales, originando respuestas funcionalmente diferentes. Estas posibilidades, así como las condiciones que determinarían la generación de uno u otro tipo de respuesta a olor, están siendo estudiadas actualmente en nuestro laboratorio.

La vía de transducción mayormente estudiada en vertebrados es de efecto excitatorio y su mensajero intracelular es el adenosín-3,5-monofosfato cíclico (AMPC; ver Figura 1A). La unión de las moléculas odorantes a receptores específicos de membrana, pertenecientes a la superfamilia de receptores con siete segmentos de transmembrana (Buck y Axel, 1991), induce la activación de la enzima adenilil ciclasa - en un proceso mediado por una proteína G ( $G_{Olf}$ ; Jones y Reed, 1989)- produciéndose un aumento en la concentración intracelular de AMPC (Pace y cols., 1985; Sklar y cols., 1986; Boekhoff y cols., 1990). Este nucleótido cíclico activa directamente una conductancia catiónica inespecífica (Nakamura y Gold, 1987) que despolariza la membrana, generando un aumento en la frecuencia de descarga. Estas respuestas electrofisiológicas excitatorias han sido observadas en neuronas olfatorias de anfibios (Trotier, 1986; Kurahashi, 1989; Firestein y Werblin, 1989; Kurahashi, 1990; Frings y Lindemann, 1990; Morales, 1995) y mamíferos (Lowe y Gold, 1993), al ser estimuladas con odorantes volátiles, y en peces (Miyamoto y cols. 1992; Ivanova y Caprio, 1993), al ser estimulados con aminoácidos.

Si bien la corriente que pasa a través de los canales activados por AMPC es llevada principalmente por el ion sodio, se ha comprobado la existencia de una componente de calcio (Kurahashi y Shibuya, 1990). El calcio que entra a la célula a través de estos canales catiónicos inespecíficos activa una conductancia de cloruro (Kleene y Gesteland, 1991; Kurahashi y Yau, 1993), lo que en las neuronas olfatorias produce una salida de este ión, equivalente a una corriente de entrada que despolariza aún más la membrana. La contribución de esta corriente de cloruro a la respuesta olfatoria excitatoria es substancial, alcanzando un 40% del total en la salamandra (Kleene, 1993), 60% en la rana (Zhainazarov, 1995) y un 85% en la rata (Loewe y Gold, 1993).

En condiciones iónicas normales (fisiológicas) el potencial de inversión de estas dos corrientes es cercano a 0 mV y la relación corriente-voltaje (I-V) de la corriente neta de transducción es creciente y aproximadamente lineal, presentando en muchos casos una rectificación de salida para potenciales negativos y, ocasionalmente, incluso una

inversión en la pendiente de la curva entre -20 mV y -40 mV (Trotier, 1986; Kurahashi, 1989; Firestein y cols., 1990; Firestein y Shepherd, 1995; ver Fig. 1B). Esta dependencia del potencial podría deberse a un bloqueo por calcio de los canales sensibles a AMPc (Chen y Yau, 1994) y/o a una dependencia del potencial intrínseca de los canales de cloruro (Firestein y Shepherd, 1995). Resultados similares se han observado en neuronas olfatorias aisladas de *C. caudiverbera* (Morales, 1995; esta Tesis).



**Figura 1. Quimiotransducción excitatoria. A.** Modelo de la cascada enzimática que culmina con la apertura de las conductancias de transducción excitatorias. **B.** Relación I-V de la corriente de transducción en condiciones iónicas normales (Kurahashi, 1989).

En algunas especies de vertebrados se han observado también respuestas inhibitorias (Dionne, 1992; Morales y cols., 1994; Kang y Caprio, 1995; Vogler y Schild, 1999; Duchamp-Viret y cols., 2000; Díaz y Bacigalupo, resultados no publicados), como resultado de la generación de un potencial de receptor hiperpolarizante que induce una disminución en la frecuencia de descarga neuronal. Sin embargo, el mecanismo involucrado en la generación de este tipo de respuestas no se conoce con precisión.

En *Caudiverbera*, se ha reportado que en la generación del potencial de receptor hiperpolarizante responsable de la inhibición participaría una conductancia de potasio activada por calcio (Morales y cols., 1994, 1995). Recientemente se ha mostrado que la misma corriente de potasio puede ser inducida por olores en neuronas olfatorias de la rata y que el tipo de respuesta – inhibición o excitación- no depende estrictamente de la mezcla de olores utilizada, sino de la neurona estimulada (Sanhueza y cols., 2000). En *Caudiverbera*, la estimulación con una mezcla de olores de tipo floral y frutal (geraniol, citronelal y citralva; mezcla I) activa con mayor frecuencia la corriente de transducción excitatoria (48%, en comparación con un 10-15% de respuestas inhibitorias; Sanhueza y cols., 2000).

Si bien no se ha determinado el mecanismo que activa la corriente de potasio, la información disponible sugiere que se trataría de una cascada de transducción (Morales y cols., 1994; Sanhueza y cols., 2000). La transducción olfativa es un proceso selectivo, es decir, sólo una fracción de las neuronas olfatorias responde a un odorante dado con la activación de una corriente de transducción; una misma neurona puede, sin embargo, responder a varios olores diferentes (Duchamp y cols., 1974; Duchamp-Viret y cols.,

2000, Kang y Caprio, 1995).

Las conductancias de transducción están localizadas principalmente en los cilios olfatorios (Kurahashi, 1989; Firestein y cols., 1990; Lowe y Gold, 1991; Morales y cols., 1995). Contrariamente, las conductancias activadas por el potencial se ubican en el cuerpo celular. En las neuronas olfatorias de *C. caudiverbera* existen cuatro diferentes corrientes activadas por despolarización: una corriente de sodio sensible a TTX que se inactiva, una corriente de calcio sostenida, una corriente de potasio tipo rectificador tardío y una corriente de potasio activada por calcio (Delgado y Labarca, 1993). Estas corrientes participan en la generación de los potenciales de acción, cuya forma y frecuencia son relevantes en el estudio de la codificación olfativa.

La mayor parte de lo que sabemos acerca de la transducción olfativa proviene de los estudios realizados en neuronas receptoras aisladas del epitelio olfatorio. La técnica de *patch-clamp* en sus diferentes modalidades ha permitido registrar los cambios en el potencial de membrana producidos por los odorantes e identificar las corrientes responsables de estos cambios.

La utilización de esta técnica electrofisiológica en neuronas aisladas de *C. caudiverbera* estimuladas con la mezcla I – por medio de micropipetas de estimulación que apuntaban hacia los cilios olfatorios, pero que permitían la llegada de los odorantes a otras zonas de la membrana celular, incluyendo el soma - reveló la existencia de ciertas anomalías en la respuesta al olor que no habían sido reconocidas hasta ahora ni en esta ni en otras especies. Estas anomalías consistían en que las corrientes inducidas por olor presentaban una variedad de formas en torno a los dos patrones conocidos (excitación e inhibición), pero que no podían ser explicadas exclusivamente por estos dos efectos. Esta observación y el propósito de identificar y describir las causas de este fenómeno, motivaron la realización de esta Tesis.

El análisis sistemático de las respuestas a la mezcla I permitió concluir que en la mayoría de los casos era posible distinguir dos efectos diferentes del olor, generados por mecanismos distintos e independientes, y localizados en diferentes regiones de las neuronas olfatorias. El primer efecto corresponde a la activación de la cascada de transducción del AMPc y se localiza en los cilios olfatorios. El estudio y caracterización del segundo efecto de las moléculas odorantes se convirtió en el objetivo principal de esta Tesis y los resultados obtenidos indican que se trata de una supresión directa e inespecífica de las conductancias activadas por el potencial, ubicadas en el cuerpo celular. Más adelante se mostrará que ambos fenómenos contribuyen a la respuesta a olor, pero son independientes, pudiendo aparecer juntos o en forma aislada. La contribución relativa y curso temporal de los dos efectos varía de una célula a otra - por razones que se discutirán posteriormente- dando lugar a la variedad de respuestas observadas. Un tercer factor de complejidad se relaciona con la existencia de respuestas de tipo inhibitorio, observadas con menor frecuencia, pero que también podían observarse junto con el fenómeno de *supresión*.

Se ha reportado que la aplicación crónica de odorantes en el medio extracelular (10 mm – 10 mM) suprime en forma inespecífica y reversible la activación, mediante pulsos despolarizantes, de las corrientes voltaje-dependientes en neuronas olfatorias de

salamandra (Kawai y cols., 1997). Los autores llamaron a este fenómeno *supresión no-selectiva*. En esta Tesis se muestra que es posible inducir una supresión parcial de las corrientes dependientes del potencial en respuesta a estímulos de olor de duración y concentración similares a los necesarios para inducir la transducción en neuronas olfatorias disociadas. Este efecto de supresión contribuye a la respuesta neta a olor en condiciones de voltaje-controlado, generando una corriente que se suma a las corrientes de transducción, lo que explica la variedad de respuestas a olor observadas. Adicionalmente, la supresión produce cambios en el potencial de membrana y modificaciones en la descarga neuronal en un rango de tiempo comparable al de las corrientes de transducción, lo que sugiere una posible función en la fisiología del olfato.

Al estudiar la respuesta neuronal a pares de pulsos de odorantes, Kurahashi y cols. (1994) observaron que el segundo pulso de olor producía una supresión de la corriente de **transducción** inducida por el primero. La posibilidad de que este efecto de las moléculas de olor sobre la corriente de transducción y la supresión de las corrientes dependientes del potencial sean generados por un mismo mecanismo será evaluada posteriormente.



## HIPÓTESIS DE TRABAJO

En esta Tesis se plantea como Hipótesis de Trabajo que el mecanismo que genera el fenómeno de supresión por olores es diferente e independiente del proceso de transducción olfativa. Se propone también que el efecto de supresión contribuye a la respuesta neta a olor en neuronas disociadas, generando cambios en el potencial de membrana que afectan la descarga neuronal, en concordancia con una posible función en la fisiología del olfato.



## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar si es posible observar una *corriente de supresión* asociada al cierre de conductancias dependientes del potencial al estimular a las neuronas olfatorias disociadas con pulsos breves de olor, en la configuración de célula completa y condiciones de voltaje controlado. Estudiar la posibilidad de que este efecto se superponga a las corrientes de transducción activadas en aquella fracción de células que responde selectivamente a los olores usados, y proponer una metodología que permita distinguir entre estos fenómenos.

2. Obtener información respecto del mecanismo de la supresión. Con este fin se determinarán la localización y latencia del fenómeno; y se investigarán sus propiedades de selectividad, es decir, se determinará el porcentaje de neuronas que exhiben supresión por pulsos de olores y se investigará si todas las corrientes voltaje-dependientes o sólo algunas de ellas son suprimidas.

3. Estudiar los efectos de la supresión por olores sobre el potencial de membrana neuronal. Estos experimentos se realizarán en la configuración de célula completa (corriente controlada) en neuronas que sólo respondan con supresión a los olores aplicados, lo que será determinado previamente en la modalidad de voltaje controlado. En neuronas que presenten actividad espontánea, se analizarán los efectos de la supresión sobre la descarga de potenciales de acción.



# MATERIALES Y METODOS

## A. Disociación de las neuronas olfatorias.

Las neuronas aisladas del epitelio olfatorio del sapo *Caudiverbera caudiverbera* fueron obtenidas mediante el siguiente procedimiento (modificado de Morales y cols., 1994), que no requiere del uso de enzimas proteolíticas:

Los animales eran enfriados hasta 0 °C para insensibilizarlos y eran sacrificados por desmedulación y descerebración, pasando un estilete a la altura de la sexta vértebra cervical. Las mucosas olfatorias de ambas fosas nasales eran removidas y colocadas en una solución de Ringer hipertónico (en mM: 120 NaCl, 4 NaOH, 3 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 5 glucosa, 5 Na<sup>+</sup>-piruvato, pH 7,5), permaneciendo en ella durante 10 minutos, lo que permitía eliminar el mucus del epitelio olfatorio. Una capa de tejido conectivo ubicada en el lado interno era retirada con una pinza y una tijera fina. Después de limpiar la solución, el epitelio era cortado en trozos de ~1mm<sup>2</sup>, los que eran trasladados a dos placas Petri de 35 mm con 2 ml de solución de cultivo cada una. La solución de cultivo consistía en el mismo Ringer hipertónico, que contenía además 1% de albúmina, 0,03 mg/ml de L-leucina, 100 UI/ml de penicilina y 0,16 mg/ml de L-glutamina. En estas condiciones, los trozos de epitelio eran conservados a 4°C y podían ser utilizados durante 48 horas. Para minimizar la contaminación, se usaba el contenido de

una placa el primer día y el de la otra el segundo.

En el momento de realizar los registros, se trasladaban 3 a 4 trozos de epitelio a un tubo Eppendorf que contenía la solución externa apropiada para cada experimento (ver Tabla 1) y se los hacía pasar, suavemente, por la punta pulida de una pipeta Pasteur. Luego de repetir esta operación unas 5 veces, el sobre-nadante era trasladado a la cámara de registro. Este procedimiento permitía obtener un número elevado de neuronas aisladas, que se mantenían en buenas condiciones durante al menos una hora. Las células eran visualizadas mediante un microscopio invertido Nikon TMS con óptica de Hoffmann, equipado con lentes objetivos de 20x y 40x.

Para obtener neuronas olfatorias aisladas de la rata (Wistar), los ejemplares eran decapitados luego de adormecerlos por la inhalación de CO<sub>2</sub> (~2 min) y los epitelios olfatorios eran extraídos de los turbinados. Luego de cortarlos en pequeños trozos, se seguía un procedimiento de disociación mecánico similar al empleado en *Caudiverbera*, sin necesidad de utilizar enzimas.

Los omatidios fueron aislados de los ojos de *Drosophila* (Oregon-R), mediante el procedimiento descrito en Bacigalupo y cols. (1995).

## **B. Registros electrofisiológicos.**

Para registrar la actividad eléctrica de las neuronas olfatorias aisladas se utilizó la técnica de *patch-clamp* en sus diferentes modalidades (Hamill y cols., 1981). Esta técnica electrofisiológica consiste en el establecimiento de un sello de alta resistencia (5 - 10 GW) entre la punta de una pipeta de vidrio que contiene al electrodo de registro y la membrana celular, lo que permite registrar corrientes y voltaje en células pequeñas como las neuronas olfatorias. Durante el desarrollo de esta Tesis se utilizó la configuración de célula completa (*whole-cell*) en las modalidades de potencial controlado y corriente controlada. Si bien esta técnica conlleva una cierta intervención externa sobre la neurona (intercambio de iones y moléculas pequeñas entre la pipeta de registro y el citoplasma), su uso permite el control de algunas variables relevantes como el potencial de membrana (voltaje controlado) o la corriente total a través de la membrana celular (corriente controlada). Es posible - por ejemplo- establecer correlaciones entre los cambios en el potencial de membrana causados por la estimulación con odorantes y las corrientes que participan en la generación de este potencial de receptor.

Las pipetas de registro se fabricaron estirando capilares de vidrio para hematocrito (Blu-Tip, Oxford Labware) mediante un estirador horizontal (Sutter Instruments Co., modelo P-80 Flaming-Brown), programado de manera de obtener pipetas con una resistencia de ~3 MW. La resistencia fue calculada aplicando pulsos de voltaje de 0,2 mV entre los electrodos de registro y de referencia (ambos de Ag/AgCl) y midiendo la magnitud de la corriente generada. Para disminuir la capacidad eléctrica de las pipetas, la pared externa de éstas era cubierta con un polímero hidrofóbico (Sylgard 184, Dow Corning Co.). Las pipetas eran llenadas con solución pseudo-intracelular (solución

interna, en mM: 120 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 4 HEPES, 2 EGTA, 0,1 Na<sub>2</sub>GTP, 1 Mg-ATP, pH 7,6, pCa 7,5 (calculado mediante el programa FreeCa)).

La pipeta de registro era acercada a la neurona olfatoria seleccionada mediante un micromanipulador motorizado (Newport Co., Model 860-C2). Una vez que la célula era tocada con la punta de la pipeta, la aplicación de una leve presión negativa en el interior de ésta permitía la obtención del sello de alta resistencia. La configuración de célula completa era alcanzada al romper la membrana celular circunscrita por la punta de la pipeta mediante una segunda succión. Las corrientes macroscópicas y el potencial de membrana eran registrados mediante un amplificador de *patch-clamp* (Dagan Co., modelo 8900; cuyo filtro se fijó en 10 kHz) en las modalidades de voltaje controlado y corriente controlada, respectivamente. Las señales provenientes del amplificador eran observadas directamente en un osciloscopio (Hitachi, modelo V-212) y digitalizadas mediante una interfase análogo-digital (Labmaster, Scientific Solutions, Inc.), siendo grabadas en el disco duro de un computador AT. El programa Clampex de pCLAMP 5.5 (Axon Instruments, Inc.) fue usado para la generación de los protocolos de estimulación y para la adquisición de los datos. Los registros de potencial fueron guardados además en una video-grabadora VHS mediante una interfase PCM (Instrutech Corp., modelo VR-10).

## C. Sistema de estimulación.

Los odorantes eran aplicados utilizando pipetas de estimulación de dos canales, fabricadas estirando capilares dobles de borosilicato (Sutter Instruments Co.) por medio del mismo estirador horizontal utilizado para la fabricación de las pipetas de registro, programado en este caso para que la punta de cada canal tuviese un diámetro de ~2 µm.

La solución que contenía a los odorantes era eyectada mediante pulsos de presión de nitrógeno (Indura), aplicados por un aparato *picospritzer* (construido por el Dr. Bacigalupo), provisto de una válvula solenoide operada por el computador. Las pipetas de estimulación eran ubicadas a 20 o 40 µm de la célula; la presión del pulso podía fijarse manualmente con un regulador a un valor entre 1 - 15 libras por pulgada cuadrada (psi), y el comienzo y duración del pulso se establecían con el computador modificando los parámetros del programa de estimulación Clampex (pCLAMP 5.5).

## D. Odorantes

El estímulo químico con que se estimulaba a las neuronas olfatorias consistía en una mezcla de tres odorantes florales y frutales disueltos en la solución externa utilizada en cada experimento, en concentraciones equimolares (1 mM):

**Mezcla I:** citralva (3,7-dimetil-2,6-octadienenitrilo), citronelal (3,7-dimetil-2,6-octenal), y geraniol (3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol). A partir de los compuestos comerciales se

preparó una solución *stock* 100 mM de cada odorante en agua bidestilada, la que era diluida en la solución externa correspondiente hasta la concentración final de 1 mM.

Con el propósito de averiguar si el fenómeno de supresión podía ser generado por odorantes de naturaleza muy diferente a los de la mezcla I, en algunos casos (están indicados) se utilizó una mezcla olores pútridos (la misma concentración):

**Mezcla II:** ácido isovalérico (ácido 3-metilbutanoico), pirazina (1,4-diazina) y trietilamina.

## **E. Determinación de la concentración de odorantes a nivel de la célula.**

Conociendo la concentración de los odorantes en el interior de la pipeta de estimulación (1 mM de cada componente), la concentración de olor que alcanza la superficie celular puede determinarse utilizando el método de Firestein y Werblin (1989). Este método permite estimar cuánto se ha diluido la solución eyectada (a una presión dada), al alcanzar la distancia a la que se encuentra la célula. Se define el *factor de dilución* ( $F$ ) como:

$$[O]_{\text{célula}} = F [O]_{\text{pipeta}} \quad (1)$$

donde  $[O]_{\text{célula}}$  es la concentración de odorantes al nivel de la célula y  $[O]_{\text{pipeta}}$  es su concentración en la pipeta.  $F$  es un parámetro que depende de la geometría de la pipeta y de la presión y distancia a la que se aplica el pulso. Para determinarlo se utiliza una solución de calibración alta en potasio ( $[K]_{\text{pipeta}} = 100 \text{ mM}$ ), la que es aplicada mediante pulsos de presión desde una pipeta de estimulación (igual a las utilizadas en los experimentos con olor), sobre una neurona olfatoria ubicada a una cierta distancia (20 o 40 mm, en esta Tesis) y mantenida en condiciones de voltaje controlado (-70 mV). El pulso de la solución de calibración aumenta temporalmente la concentración de potasio cerca de la célula, lo que altera el potencial de equilibrio de ese ion, generándose una corriente de entrada  $i_K$ . Como se muestra a continuación, la medición de  $i_K$  permite estimar la concentración de potasio cerca de la célula ( $[K]_{\text{célula}}$ ) y con ello el factor de dilución, para los valores de presión y distancia dados:

$$F = \frac{[K]_{\text{célula}}}{[K]_{\text{pipeta}}} \quad (2)$$

La corriente de membrana generada en la célula por el pulso de solución de calibración es:

$$i_K = g_K (E_K' - E_K) \quad (3)$$

$g_K$  es la conductancia de potasio de la célula a  $-70$  mV;  $E_K$  y  $E_K'$  son los potenciales de equilibrio antes y durante la aplicación del pulso de calibración. Si  $[K]_{ext}$  es la concentración de potasio extracelular anterior al pulso (2.5 mM), y  $[K]_{int}$  es la concentración intracelular, entonces

$$E_K = \left( \frac{RT}{F} \right) \ln \left\{ \frac{[K]_{ext}}{[K]_{int}} \right\} \quad (4.a)$$

$$y \quad E_K = \left( \frac{RT}{F} \right) \ln \left\{ \frac{[K]_{célula}}{[K]_{int}} \right\} \quad (4.b)$$

Reemplazando (4.a) y (4.b) en (3), se obtiene:

Fig006.gif

El valor de la conductancia total de potasio ( $g_K$ ) a un potencial determinado depende de la célula que se está usando y puede ser estimado midiendo la corriente de potasio máxima ( $i_{K_{máx}}$ ), generada por un pulso de potasio de larga duración ( $> 4$  s), aplicado con la presión máxima (15 psi). En este caso particular, es posible suponer que la concentración a nivel de la célula alcanza un valor similar al del interior de la pipeta, lo que permite estimar la magnitud de  $g_K$  a partir de la ecuación (5):

$$\left( \frac{RT}{F} \right) g_K = i_{K_{máx}} \ln \left\{ \frac{[K]_{ext}}{[K]_{pipeta}} \right\} \quad (6)$$

Para pulsos de duración e intensidad arbitrarios, la corriente de entrada generada es, entonces:

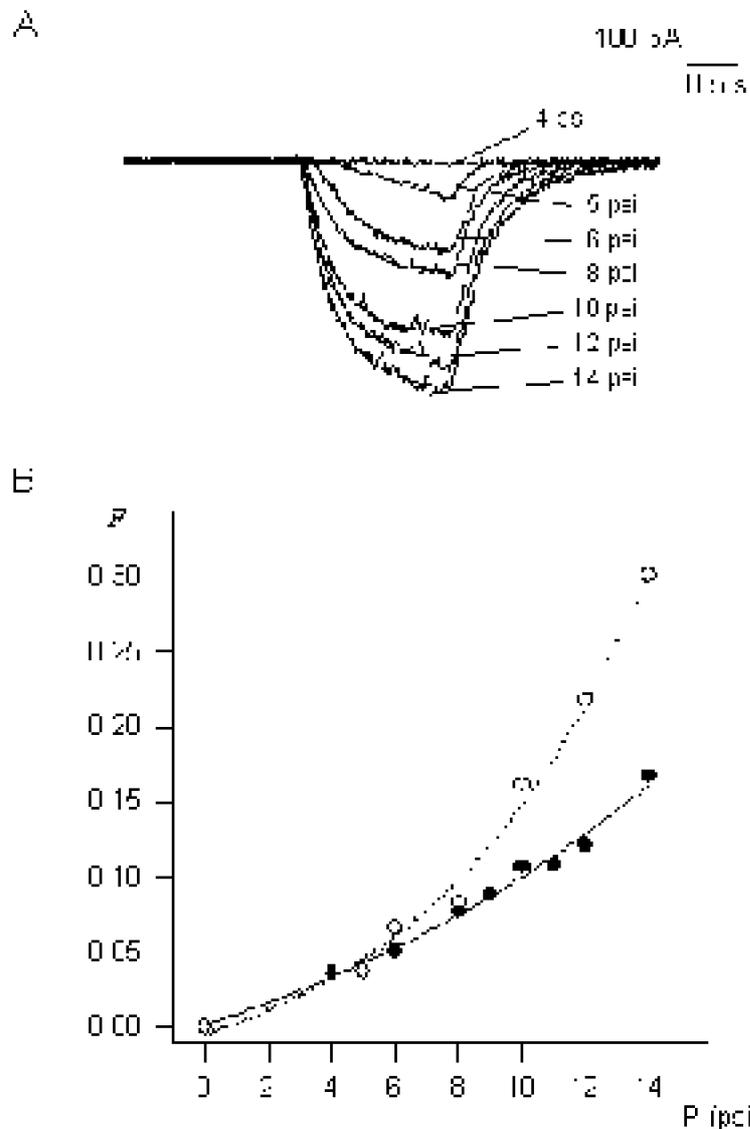
$$i_K = i_{K_{máx}} \ln \left\{ \frac{[K]_{ext}}{[K]_{pipeta}} \right\} \ln \left\{ \frac{[K]_{célula}}{[K]_{ext}} \right\} \quad (7)$$

Por lo tanto, midiendo la amplitud de esta corriente se puede deducir la concentración de potasio alcanzada a nivel de la célula durante el pulso:

$$[K]_{célula} = [K]_{ext} \exp \left\{ \frac{i_K i_{K_{máx}}^{-1}}{\ln \left( \frac{[K]_{ext}}{[K]_{pipeta}} \right)} \right\} \quad (8)$$

donde  $[K]_{ext} = 2,5 \text{ mM}$  y  $[K]_{pipeta} = 100 \text{ mM}$ . Conociendo  $[K]_{célula}$  puede calcularse el factor de dilución  $F$  (Eq. (2)), parámetro que depende de la distancia y la presión. Si se aplica una serie de pulsos (de duración fija y desde una distancia dada), aumentando gradualmente la presión ( $P$ ), es posible construir una curva  $F$  vs.  $P$ . Si bien para obtenerla se ha utilizado una neurona particular, esta curva es válida para cualquier célula si se mantienen las dimensiones de la pipeta de estimulación y su distancia al punto de interés. Esta curva de calibración puede ser utilizada para estimar la concentración de odorantes en un punto dado en función de la presión, conociendo la concentración en el interior de la pipeta (Ec. (1)).

Durante el desarrollo de esta Tesis se aplicaron pulsos de olor de 0,3, 0,5 ó 1,5 s de duración ( $P \leq 14 \text{ psi}$ ) desde 20 ó 40 mm de distancia de las células. Para estimar la concentración de olor a nivel celular se construyeron las correspondientes curvas de calibración ( $[O]_{célula}$  vs  $P$ ). Dos ejemplos de estas curvas se muestran en la Fig. 2.



**Figura 2. Calibración de las pipetas de estímulo. A. Familia de corrientes de entrada**

generadas en una célula (mantenida a  $-70$  mV) por pulsos de presión creciente de una solución alta en potasio (100 mM en la pipeta de estímulo), aplicados desde una distancia  $d = 20$  mm. El curso temporal de cada corriente fue ajustado a una exponencial simple. **B.** Factor de dilución ( $F$ ) en función de la presión ( $P$ ), determinado a partir de las curvas en A (") y de similares registros obtenidos para  $d = 40$   $\mu$ m (I).  $[K]_{\text{célula}}$  y  $F$  fueron calculados mediante las Eqs. 8 y 2, respectivamente.

## F. Soluciones.

Las soluciones usadas en los diferentes experimentos realizados en *C. caudiverbera* se resumen en la siguiente tabla:

TABLA 1

Soluciones Externas (mM)						Soluciones Internas (mM)	
Componentes	Ringer normal	Ringer litio	Ringer 0-Ca <sup>2+</sup>	Ringer 0-Na <sup>+</sup> , TEA	Sol. alto K <sup>+</sup>	Sol. Int. normal	Sol. Int. cesio
NaCl	115	-	115	-	17,5	-	-
LiCl	-	115	-	-	-	-	-
KCl	2,5	2,5	2,5	-	100	120	-
CsCl	-	-	-	-	-	-	120
MgCl <sub>2</sub>	1,5	1,5	1,8	1,5	1,5	1	1
CaCl <sub>2</sub>	1	1	0,5	10	1	1	1
HEPES	10	10	10	10	10	4	4
EGTA	-	-	2	-	-	2	2
NMDG	-	-	0,9	79,5	-	-	-
Na <sub>2</sub> -GTP	-	-	-	-	-	0,1	0,1
Mg-ATP	-	-	-	-	-	1	1
glucosa	3	3	3	3	3	-	-
TEA-Cl	-	-	-	20	-	-	-
pH	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6
pCa	-	-	8	-	-	7.5	7.5

Las soluciones utilizadas en los experimentos realizados en la rata y en *Drosophila* fueron:

**Rata:** Solución externa (en mM): 137 NaCl, 5,4 KCl, 1,3 CaCl<sub>2</sub>, 1,5 MgCl<sub>2</sub>, 0,7 MgSO<sub>4</sub>, 0,3 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,2 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,6. Solución interna: la misma solución utilizada en el sápo.

**Drosophila :** Solución externa (en mM): 20 NaCl, 5 KCl, 1,5 CaCl<sub>2</sub>, 8 MgSO<sub>4</sub>, 10

HEPES, 25 prolina, 2,5 sacarosa; pH 7,5. Solución interna: 124 KCl, 0,1 CaCl<sub>2</sub>, 2MgSO<sub>4</sub>, 1,1 EGTA, 10 HEPES, 0,5 GTP, 2 ATP, pH 7,15; pCa 7,3 (FreeCa).

## **G. Análisis de los resultados.**

Para el análisis de los registros se utilizó el programa Clampfit de pCLAMP-6 (Axon Instruments, Inc.). Los ajustes de los datos experimentales fueron realizados usando este mismo programa o el programa N-fit (University of Texas Medical Branch, Galveston). Para la elaboración de las figuras presentadas en esta Tesis se utilizaron los programas SigmaPlot (Jandel Corp.) y Photoshop (Adobe Systems, Inc.).

## **H. Lista de reactivos.**

Los reactivos usados y su procedencia se enumeran a continuación:

### **1. Bloqueadores:**

---

- Caribdotoxina (ChTX) Latoxan, Rosans, France.
- Tetraetilamonio (TEA) Sigma Chemical Co. St Louis. MO.

### **2. Odorantes:**

---

- citronelal (3,7-dimetil-2,6-octenal) “
- geraniol (3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) “
- ácido isovalérico (ácido 3-metilbutanoico) “
- pirazina (1,4-diazina) “
- trietilamina. “
- citralva (3,7-dimetil-2,6-octadienenitrilo) Donación del Dr. D. Restrepo

### **3. Otros reactivos:**

---

- Penicilina G Sigma Chemical Co. St Louis. MO.
- L-Leucina “
- L-Glutamina “

Las sales y los solventes que no aparecen en esta lista fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. St Louis. MO.

Los experimentos se realizaron a una temperatura de  $\sim 22^{\circ}\text{C}$ .



## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en esta Tesis se han dividido en tres partes. En la primera (I) se exponen las características morfológicas de las neuronas olfatorias aisladas y sus propiedades electrofisiológicas (conductancias dependientes del potencial y ejemplos de la actividad espontánea generada por éstas). Como se verá más adelante, en el estudio y caracterización de la respuesta a olor en neuronas olfatorias aisladas, son factores relevantes tanto el repertorio de canales activados por el potencial de las células, como su forma y tamaño (debido al sistema de estimulación química utilizado). En la segunda parte (II) se muestran ejemplos de las corrientes activadas por la mezcla I que no pueden ser explicadas únicamente por la activación de las conductancias de transducción, sino que resultan de una combinación de la acción de estas últimas y un efecto diferente de las moléculas odorantes: la supresión por olor. La tercera parte (III) está dividida en cinco secciones en que: se presenta y caracteriza el fenómeno de supresión, distinguiéndolo de la transducción olfatoria (A); se muestra que la supresión es un efecto sobre los canales activados por el potencial y que su mecanismo de acción es independiente de la cascada de eventos intracelulares que culmina con la apertura de las conductancias de transducción (B); se muestra que la supresión es un efecto inespecífico tanto en lo que se refiere a su blanco como a la diversidad de olores capaces de inducirla (C); se presenta un ejemplo de supresión por olor en neuronas no olfatorias (D); y, por último, se evalúa el posible significado fisiológico de la supresión (E).

# I MORFOLOGÍA Y PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS NEURONAS OLFATORIAS AISLADAS

## A. Características morfológicas de las neuronas olfatorias aisladas.

---

Las células receptoras, disociadas del epitelio olfatorio mediante el proceso de disociación mecánico descrito en el capítulo Métodos, mantienen en general las características morfológicas que presentan *in situ* (Morales, 1995). Son neuronas bipolares con un soma esférico u ovalado, de 8 - 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. La dendrita tiene un diámetro de 1 - 2  $\mu\text{m}$ , presentando un ensanchamiento en el extremo distal que corresponde al botón dendrítico; su longitud es altamente variable, pudiendo ser prácticamente indistinguible o medir hasta unos 35  $\mu\text{m}$ . Un porcentaje importante de neuronas aisladas conserva sus cilios olfatorios (entre 4 y 10), los que se originan en el botón dendrítico. El diámetro de los cilios es de  $\sim 0,2 \mu\text{m}$  (Smith, 1991) y su longitud oscila entre 20 y 40  $\mu\text{m}$ . En *C. caudiverbera* es común observar movimientos ondulatorios de los cilios olfatorios, los que muchas veces generan movimientos de toda la célula. Este hecho permite distinguir a las neuronas de los otros componentes celulares del epitelio olfatorio, sobre todo en casos en que la dendrita y los cilios no son claramente visibles.

## B. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas olfatorias.

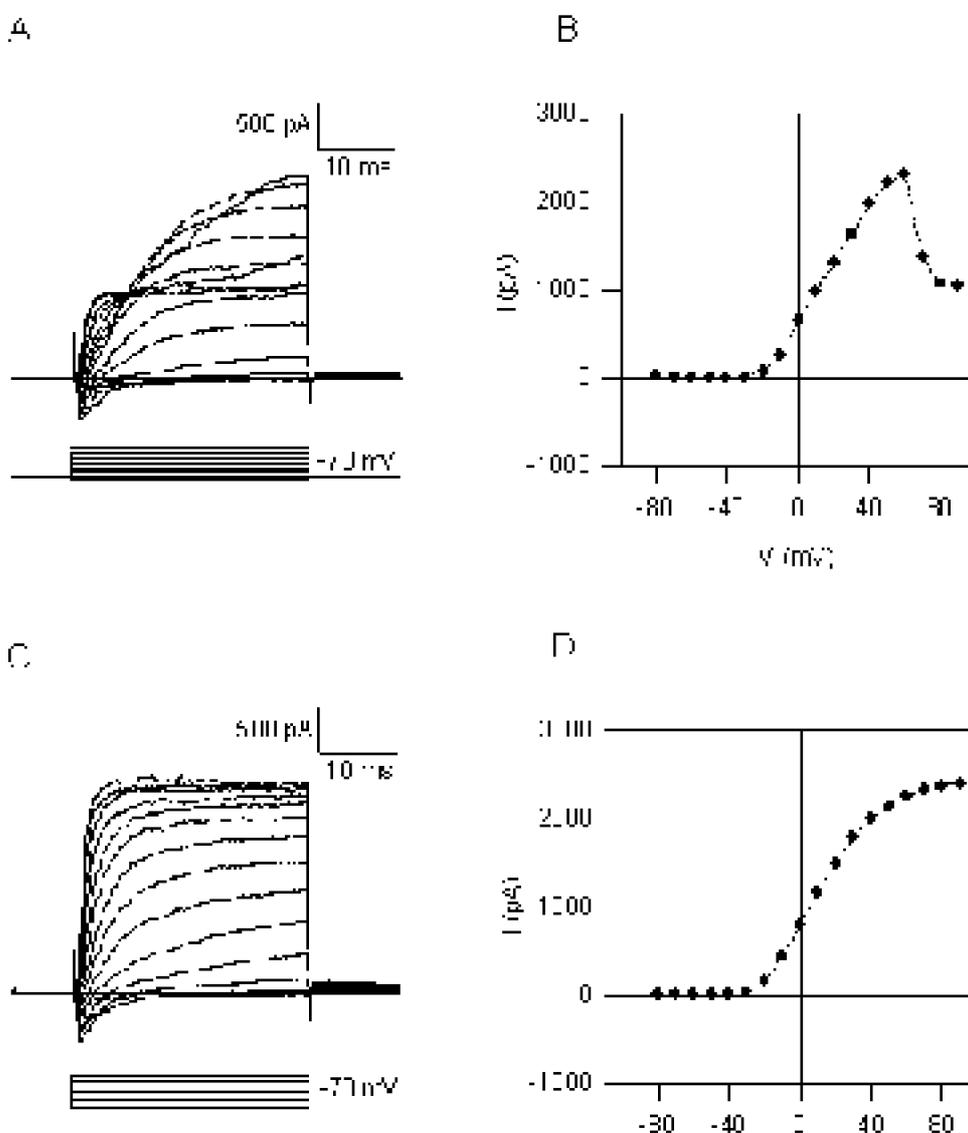
---

### 1. Conductancias dependientes del potencial.

En las neuronas olfatorias de *C. caudiverbera* se ha reportado que existen cuatro corrientes dependientes del potencial (Delgado y Labarca, 1993): una corriente de sodio sensible a TTX que se inactiva ( $I_{\text{Na}}$ ), una corriente de calcio sostenida ( $I_{\text{Ca}}$ ), una corriente de potasio tipo rectificador tardío ( $I_{\text{KV}}$ ) y una corriente de potasio activada por calcio ( $I_{\text{KCa}}$ ). Para estudiar estas corrientes se utilizó la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula completa y la modalidad de voltaje controlado. A partir de un potencial de mantención ( $V_{\text{Mant}}$ ) de  $-70 \text{ mV}$ , se aplicó una serie de pulsos de potencial de 40 ms de duración, desde  $-80 \text{ mV}$  hasta  $+90 \text{ mV}$ , en incrementos sucesivos de 10 mV.

La Figura 3 (A y C) muestra dos ejemplos representativos de las corrientes activadas por el potencial, al aplicar el protocolo descrito anteriormente a dos neuronas olfatorias diferentes. En ambos casos se observa la activación de la corriente de entrada  $I_{\text{Na}}$  y su rápida inactivación. Las corrientes de salida de potasio se activan más lentamente que las de sodio y las correspondientes curvas I-V - construidas con el valor de la corriente al

final de cada pulso de potencial- se grafican en las Figuras 3B y 3D. Si bien en ambos casos la corriente de salida de potasio está constituida por los componentes  $I_{KV}$  e  $I_{KCa}$ , la contribución de  $I_{KCa}$  es mayor en el primer caso, donde la curva I-V de la corriente neta tiene la forma característica asociada a este tipo de conductancias (Hille, 1992). La corriente de entrada de calcio  $I_{Ca}$ , activada por los pulsos despolarizantes y responsable de la posterior activación de la conductancia de potasio, no es apreciable en condiciones normales, siendo enmascarada por las corrientes de salida. Sin embargo, tanto esa corriente como las otras tres corrientes dependientes del potencial pueden ser parcial o totalmente aisladas utilizando la farmacología y/o el reemplazo de iones apropiado para cada caso. Con el fin de investigar -posteriormente- si el fenómeno de supresión afectaba a las diferentes conductancias voltaje-dependientes, se utilizaron algunas de éstas aproximaciones, reproduciéndose los resultados obtenidos por otros autores (Delgado y Labarca, 1993; Madrid y cols., manuscrito en preparación), en lo que se refiere a la capacidad de visualizar separadamente las diferentes corrientes.



**Figura 3. Corrientes activadas por potencial en neuronas olfatorias de C.**

*caudiverbera*. **A.** Familia de corrientes inducidas en una neurona (en condiciones de voltaje controlado) por una serie de pulsos de potencial desde -80 mV hasta +90 mV, en incrementos de 10 mV ( $V_{Mant} = -70$  mV). **B.** Curva I-V de la corriente neta de potasio medida al final de cada pulso de potencial. **C.** y **D.** Igual que A y C, en otra neurona olfatoria.

### **a. Corrientes de sodio ( $I_{Na}$ ) y calcio ( $I_{Ca}$ ):**

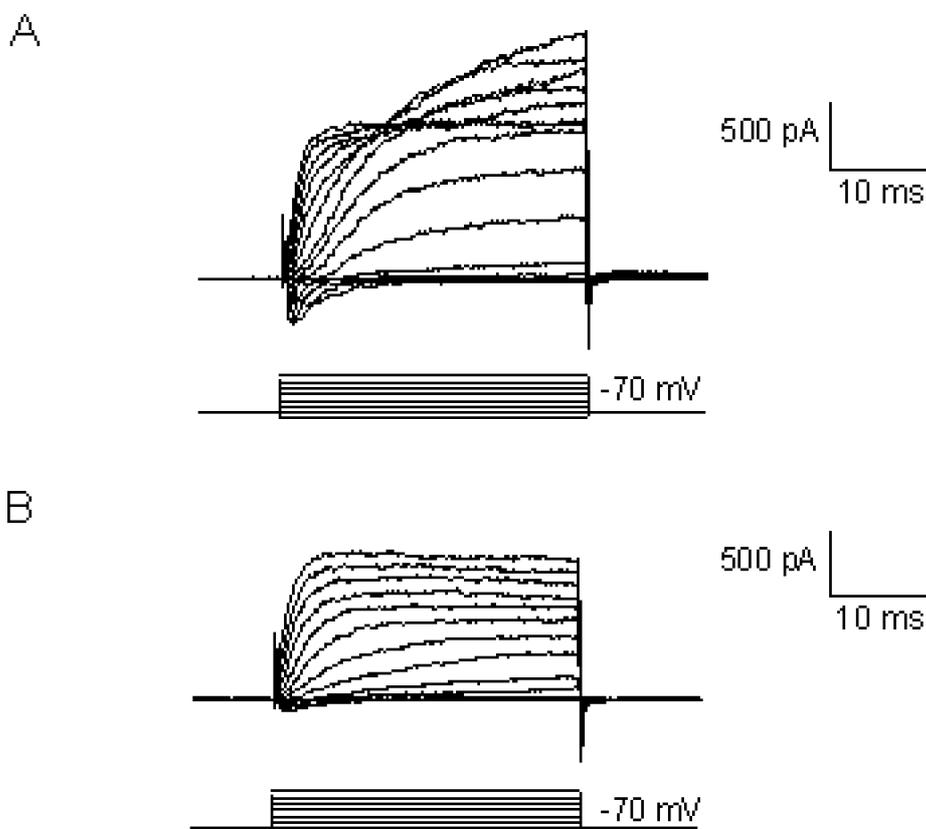
Utilizando cesio en reemplazo de potasio en la solución interna se bloquean las corrientes de salida, lo que permite observar con mayor claridad el desarrollo e inactivación de la corriente  $I_{Na}$ . La Fig. 4A muestra un registro de la familia de corrientes  $I_{Na}$  obtenida al aplicar a una neurona el protocolo de pulsos de potencial descrito anteriormente, en presencia de cesio en la pipeta de registro. La relación I-V construida con los picos de esta corriente se presenta en la Fig. 4B.  $I_{Na}$  es la corriente más rápida, alcanzando su valor máximo luego de 1 - 3 ms (antes de que exista una activación apreciable de las demás conductancias), y se inactiva totalmente después de unos 10 ms. En cuanto a su dependencia del potencial,  $I_{Na}$  comienza a ser visible a -40 mV, alcanzando su valor máximo a un potencial de -10 mV e invirtiendo su signo cerca de +60 mV.

En la mayoría de los casos, para poder distinguir además la corriente mantenida de calcio, es necesario agregar 20 mM de TEA a la solución externa, lo que - junto con el cesio en la pipeta de registro- permite el bloqueo total de las conductancias de potasio. En la Fig. 5, se muestra un experimento realizado en estas condiciones, donde además ha sido reemplazado el sodio presente en la solución externa por N-metil-D-glucamina (NMDG; catión monovalente no permeable), lo que permite el aislamiento total de la conductancia de calcio activada por el potencial. La concentración de calcio en el medio extracelular ha sido aumentada de 1 a 10 mM para magnificar el efecto. Esta corriente de entrada mantenida comienza a ser visible a potenciales más despolarizados que la de sodio (alrededor de -20 mV) y alcanza su máximo valor entre +20 y +30 mV.

### **b. Corrientes de potasio ( $I_{KV}$ e $I_{KCa}$ ):**

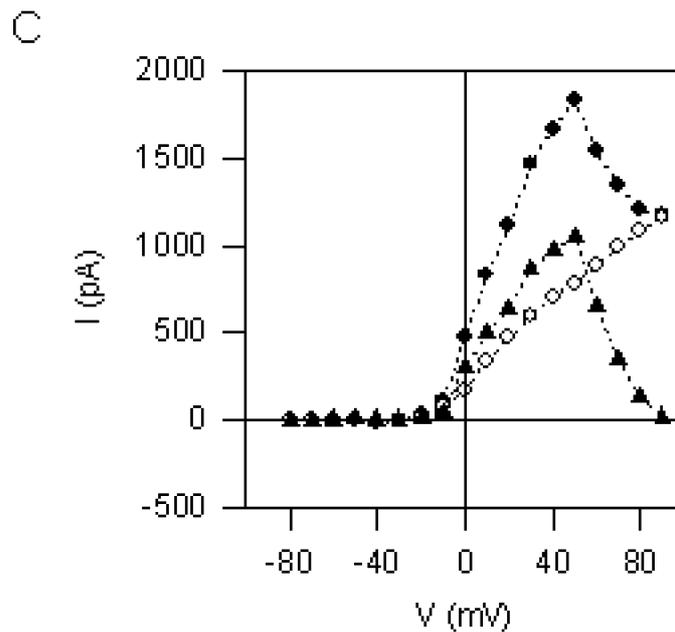
La contribución de  $I_{KCa}$  a la corriente neta de salida puede ser eliminada al bajar drásticamente la concentración de calcio extracelular. Esto se debe a que el calcio necesario para la activación de esta corriente es el que entra a la célula a través de los canales de calcio activados por el pulso despolarizante (ver Fig. 5). La Figura 6 muestra la modificación que sufre la corriente de salida al reemplazar, durante unos minutos, la solución externa normal (1 mM de  $Ca^{++}$ ) por una solución baja en calcio (solución 0- $Ca^{++}$  en Tabla 1; ~10 mM de  $Ca^{++}$  contaminante). Esta sustitución se realiza utilizando un sistema de perfusión de la cámara de registro (ver Métodos), mientras la neurona es mantenida en la configuración de célula completa (voltaje controlado). En la Fig. 6A se aprecia la activación de las diferentes conductancias voltaje-dependientes, en condiciones iónicas normales. La Fig. 6B muestra el cambio sufrido por las corrientes de salida mientras la célula es bañada por una solución baja en calcio. Como vemos, tanto la magnitud de estas corrientes, como su desarrollo temporal, se ven modificados. En C se comparan las curvas I-V construidas con los valores de la corriente al final cada pulso de

voltaje, antes (círculos llenos) y después de la perfusión (círculos vacíos). Esta última corriente corresponde a una corriente de potasio del tipo rectificador tardío, quizás con algún remanente de  $I_{KCa}$ . La substracción de ambas curvas da la relación I-V de la corriente de potasio activada por calcio. Luego de perfundir la cámara de registro con la solución externa normal, se recupera el patrón inicial (no se incluye). Este procedimiento también se utilizó posteriormente para investigar si ambas corrientes presentaban supresión por odorantes. En la Fig. 6B puede notarse que la perfusión con la solución baja en calcio produjo también una reducción en la magnitud de las corrientes transitorias  $I_{Na}$ . Este efecto se debe, probablemente, a un desplazamiento de la curva de inactivación de las corrientes de sodio hacia potenciales más hiperpolarizados, causado por la disminución en la concentración externa de calcio (Delgado y Labarca, 1993).



**Figura 6. Separación de la corriente de salida de potasio en sus dos componentes.**

**A.** Corrientes activadas por el potencial en una neurona bañada en solución externa normal. **B.** La misma neurona que en A, luego de reemplazar la solución externa por una solución baja en calcio. **C.** Curvas I-V de  $I_o$  (I) y de  $I_{KV}$  (O), medidas al final de cada pulso de potencial en A y B, respectivamente. Al restar la segunda curva a la primera se obtiene la relación I-V de  $I_{KCa}$  (s).



## 2. Actividad eléctrica espontánea de las neuronas olfatorias.

Para registrar la descarga espontánea de potenciales de acción se utilizó la configuración de célula completa en la modalidad de corriente controlada (corriente de mantención = 0 pA). La Figura 7 muestra dos tipos de patrones de descarga de potenciales de acción espontáneos registrados en diferentes células. Si bien la mayoría de las neuronas olfatorias presenta una descarga irregular (Morales, 1995), se han incluido dos ejemplos registrados con relativa frecuencia durante el desarrollo de esta Tesis. El primero muestra un patrón de descarga altamente regular, con una frecuencia de disparo de ~180 PA/min (Fig. 7A). El segundo ejemplo corresponde a una neurona olfatoria que presentaba una descarga espontánea en la que se alternaban períodos de actividad y de silencio. Esta actividad eléctrica espontánea resulta de la acción conjunta de las conductancias dependientes del potencial mencionadas en la sección anterior.



**Figura 7. Actividad espontánea en neuronas olfatorias aisladas de *C. caudiverbera*.**

**A.** Registro realizado en condiciones de corriente controlada en una neurona que mostraba una descarga regular de potenciales de acción. **B.** Otro ejemplo, correspondiente a una neurona que disparaba esporádicamente pares de potenciales de acción.

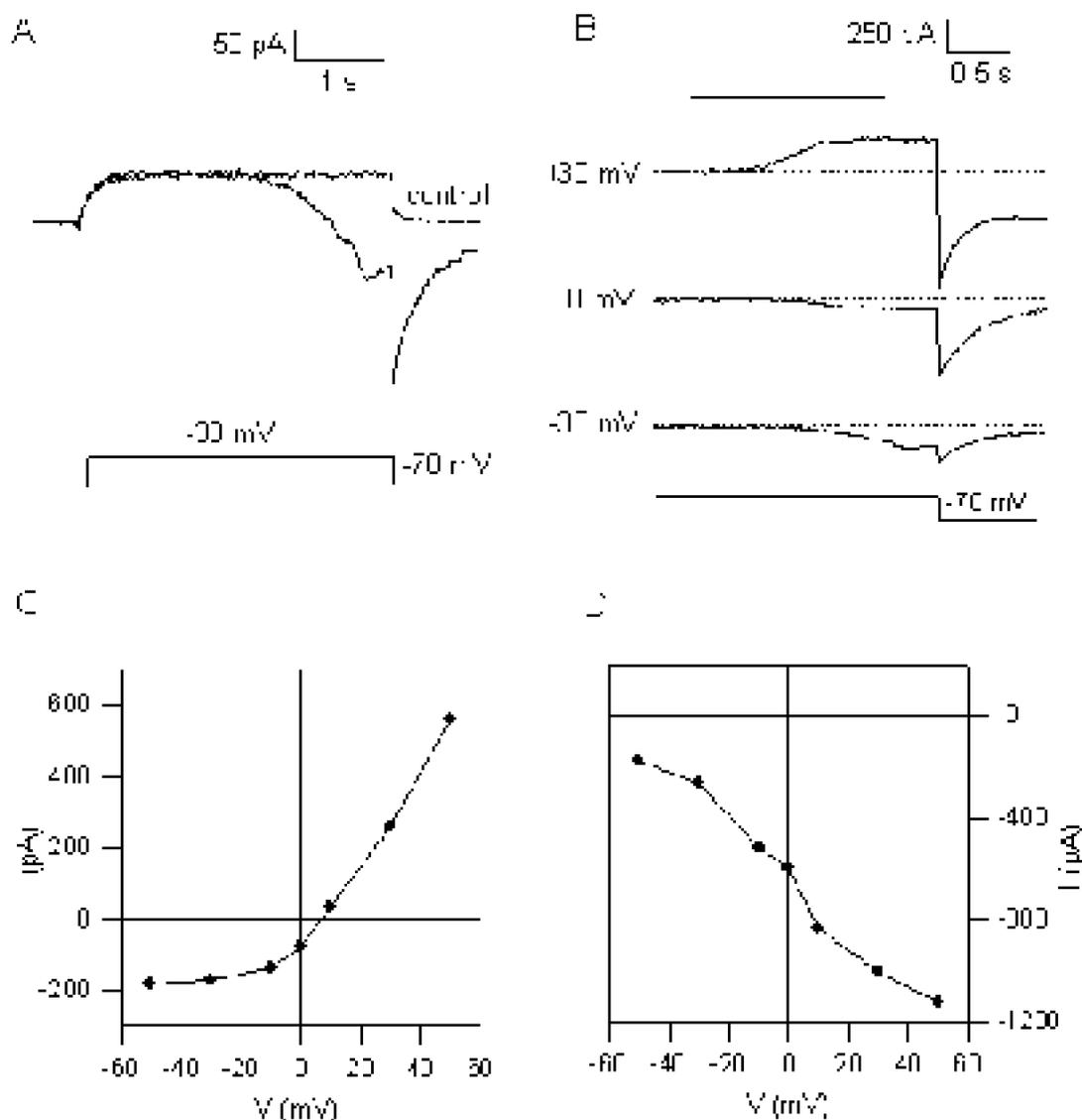
## II DIVERSIDAD DE RESPUESTAS A LA ESTIMULACIÓN CON ODORANTES FLORALES Y FRUTALES

Los cambios en la frecuencia de descarga inducidos por los odorantes se deben a la generación de un potencial de receptor despolarizante o hiperpolarizante causado por la apertura de diferentes conductancias de transducción. En la configuración de célula completa y la modalidad de voltaje controlado, es posible registrar la corriente de transducción activada por un estímulo dado, a un cierto valor del potencial. Repitiendo el protocolo de estimulación para diferentes potenciales, se obtiene la curva I-V de la corriente de transducción, lo que permite obtener información respecto de la selectividad y dependencia del potencial de las conductancias involucradas.

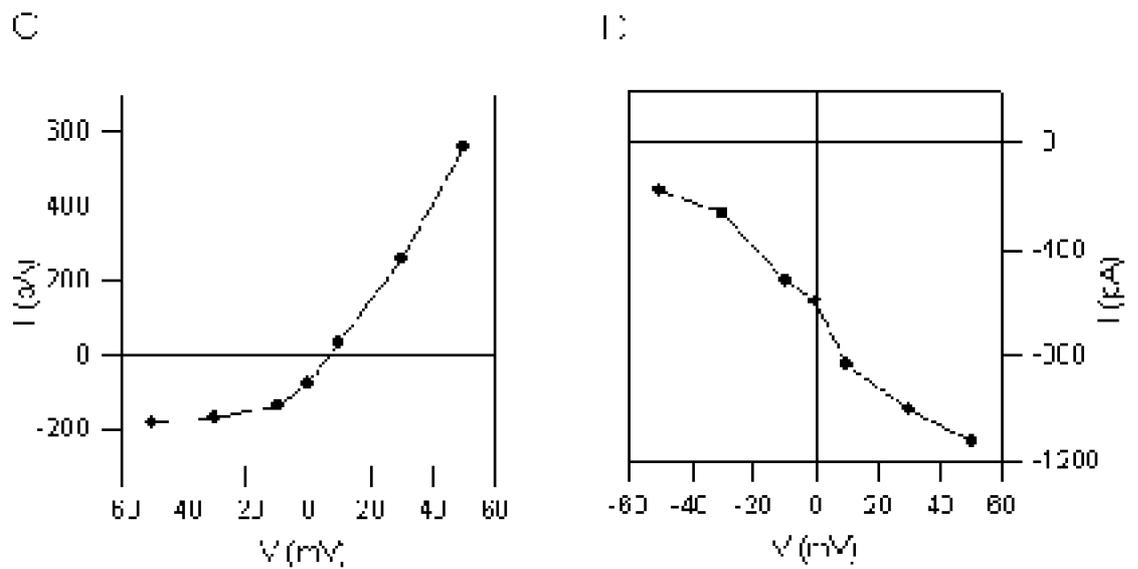
Utilizando esta metodología y con el objetivo de reproducir algunos resultados generales obtenidos en esta y otras especies de vertebrados, se estudiaron las respuestas generadas en diferentes neuronas olfatorias por pulsos similares de una mezcla de olores florales y frutales (Mezcla I: geraniol, citronelal y citralva). Los olores fueron aplicados mediante una pipeta de estimulación de dos cañones (ver Métodos) y el estímulo era dirigido a los cilios olfatorios. Sin embargo, nuestro sistema de estimulación no impedía que los olores alcanzaran en alguna medida otras zonas de la superficie celular, incluyendo el soma, particularmente en neuronas con dendrita corta o ausente.

En condiciones iónicas normales, el potencial de inversión de la corriente de transducción excitatoria es cercano a 0 mV, teniéndose corrientes de entrada (negativas) para potenciales negativos y corrientes de salida (positivas) para potenciales positivos (ver Fig. 1). Sin embargo, los registros obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis con frecuencia diferían de este patrón, mostrando una amplia variabilidad en las corrientes registradas al estimular a las neuronas olfatorias aisladas con la mezcla I. A continuación se describirán algunos ejemplos representativos de estas respuestas, obtenidas en la configuración de célula completa y la modalidad de voltaje controlado.

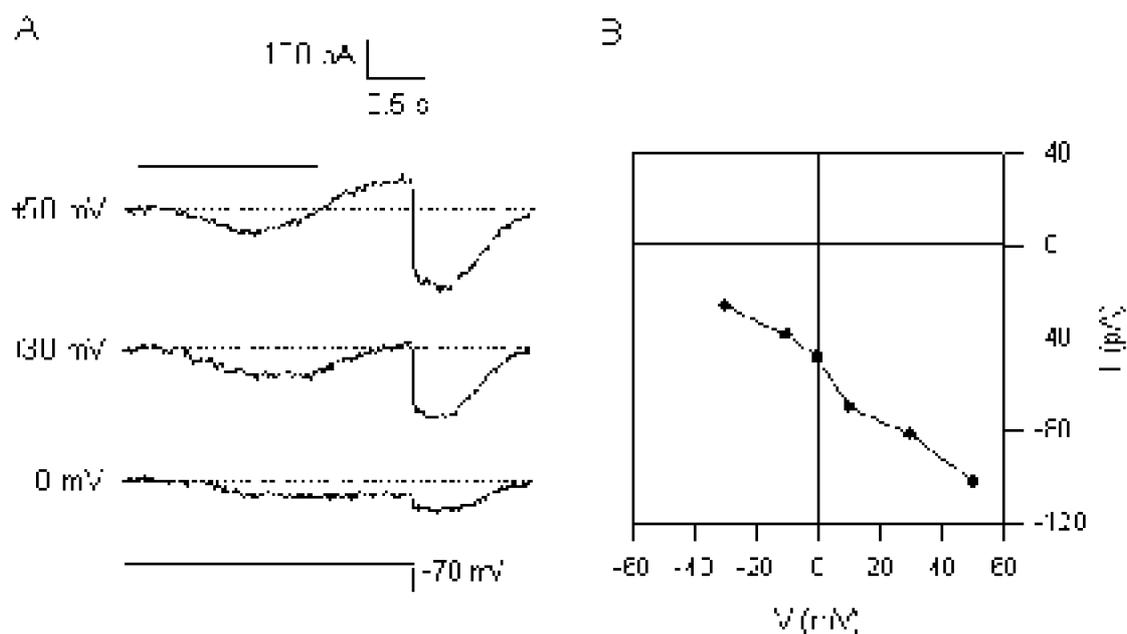
La Fig. 8A muestra la corriente activada en una neurona olfatoria por un estímulo de olor de 1,5 s, aplicado mientras el potencial de membrana era temporalmente llevado a  $-30$  mV ( $V_{\text{Mant}} = -70$  mV). El pulso de voltaje despolarizante de 4 s activó las conductancias voltaje-dependientes, siendo visibles - luego de la inactivación de la corriente de sodio- sólo las corrientes de salida de potasio. La posterior estimulación con la mezcla de olores florales y frutales indujo una corriente de entrada que se superpuso a la corriente de salida voltaje-dependiente. Al volver a  $-70$  mV se observa una corriente de cola, debido a que los canales de transducción se encuentran aún abiertos. Tanto la corriente de entrada activada a  $-30$  mV como la existencia de esta corriente de cola son características de la activación de la vía excitatoria (Trotier, 1986; Kurahashi, 1989; Firestein y cols., 1990; Firestein y Shepherd, 1995). Junto a esta curva se incluye un control en que un pulso de solución Ringer - de similares características al anterior- es aplicado a la célula. El efecto neto producido por el olor a este potencial se obtiene al restar ambas curvas. En la Fig. 8B se muestra esta corriente neta, junto a las obtenidas a 0 mV y  $+30$  mV. A 0 mV se observa una corriente de entrada de unos 80 pA, lo que resulta sorprendente, puesto que ése es justamente el potencial de inversión de la corriente responsable del efecto excitatorio y uno no esperaría registrar corriente alguna. La relación I-V de la corriente activada por el olor, construida con estos y otros valores del potencial (registros no incluidos), se muestra en la Fig. 8C. Vemos que se observa un desplazamiento anómalo de la curva hacia la derecha, con un potencial de inversión cercano a  $+10$  mV. La relación I-V de las corrientes de cola (Fig. 8D) muestra, sin embargo, la forma característica asociada a la activación de la vía excitatoria (Firestein and Shepherd, 1995).



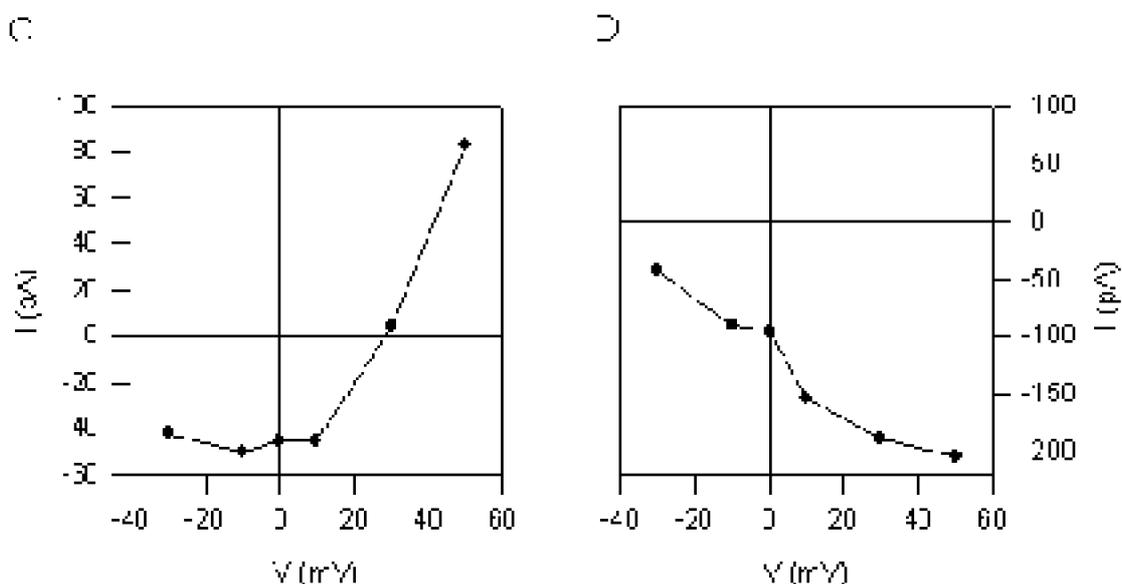
**Figura 8. Corriente inducida por la mezcla I. (Ejemplo 1).** **A.** A una neurona mantenida en condiciones de voltaje controlado ( $V_{Mant} = -70$  mV) se le aplicó un estímulo de olor (barra) durante una despolarización a  $-30$  mV. A la corriente de salida activada por el pulso de potencial se suma una corriente de entrada inducida por el olor. Al volver al  $V_{Mant}$  se observa una corriente de cola. En forma superpuesta se muestra un registro obtenido con el mismo protocolo, reemplazando el estímulo de olor por un pulso de Ringer (control). **B.** Corrientes inducidas por olor ( $I_{OD}$ ) y sus respectivas corrientes de cola, obtenidas al restar la corriente control, a tres potenciales diferentes **C.** Curva I-V construida con los valores máximos de  $I_{OD}$ . **D.** Corrientes de cola vs. potencial del prepulso.



En la Fig. 9A se muestra la respuesta de otra neurona olfatoria, sometida a un protocolo de estimulación similar. En este caso se han incluido los registros de la corriente neta activada por el olor - habiéndose ya restado la curva control- obtenidos a 0, +30 y +50 mV. Una vez más, se observa una corriente negativa al estimular a 0 mV, esta vez de unos 40 pA de magnitud. En el registro obtenido a +30 mV la corriente de entrada es aún mayor y muestra una rápida recuperación, llegando incluso a sobrepasar levemente la línea base y sugiriendo la existencia de una segunda componente de signo positivo. Dicha componente tardía parece estar ausente a 0 mV, pero se hace totalmente evidente a +50 mV, donde la corriente activada por el olor adquiere una forma claramente bifásica. En la Fig. 9B se presenta la curva I-V construida con los valores máximos de la corriente de entrada temprana. Como vemos, la primera componente es siempre negativa, creciendo en magnitud al aumentar el voltaje, en una forma aparentemente lineal. En la Figura 9C se ha construido la I-V de la corriente neta al final del pulso de potencial, cerca del máximo de la componente tardía. Dicha curva I-V es creciente, similar en forma a la obtenida en el caso de la célula anterior, pero notoriamente más desplazada hacia la derecha, cambiando de signo cerca de +30 mV. Tanto la presencia de corrientes de cola, como la dependencia de voltaje de estas últimas (Fig. 9D), indican que la vía excitatoria está activa.

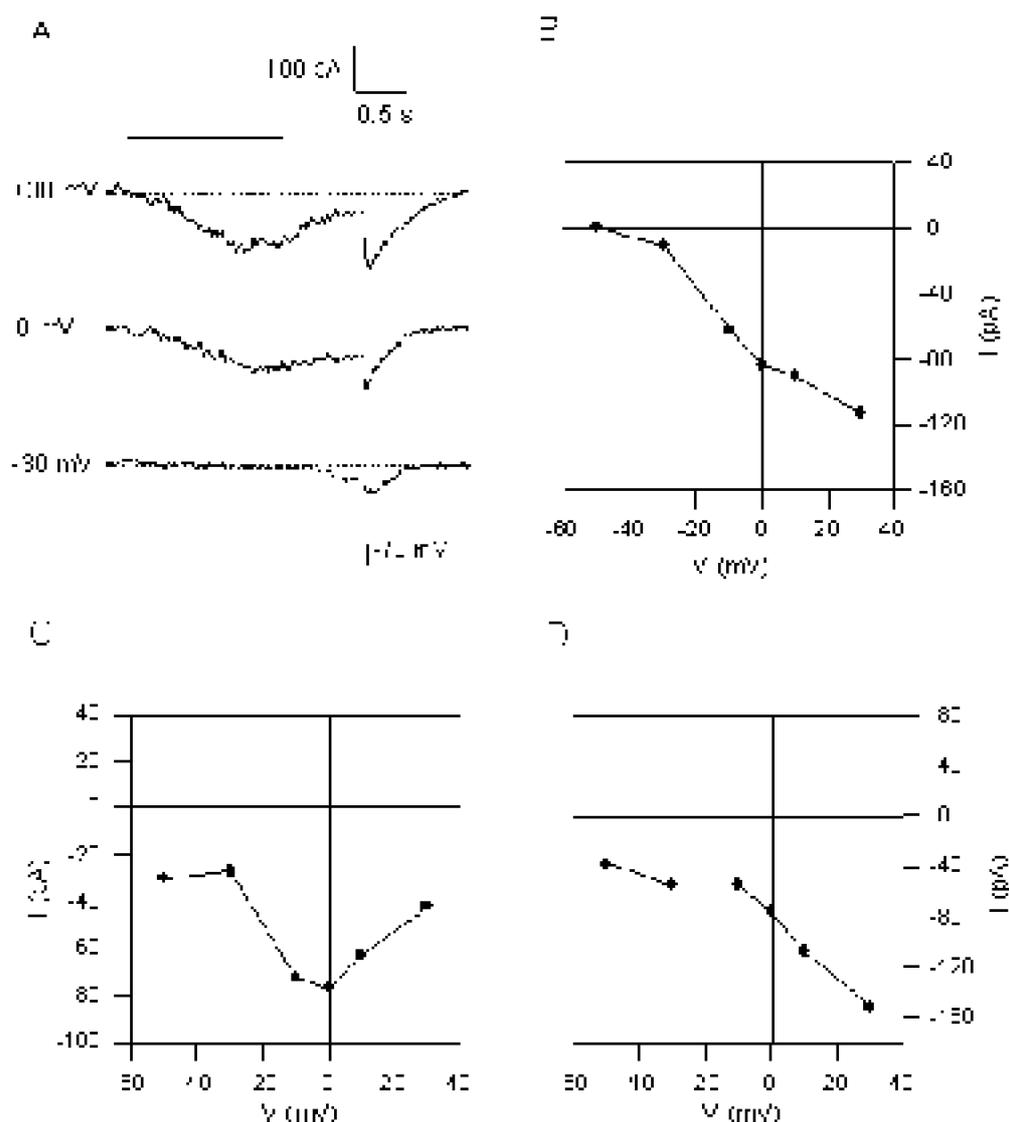


**Figura 9. Corriente inducida por la mezcla I. (Ejemplo 2).** **A.** Corrientes inducidas por olor ( $I_{OD}$ ) y sus respectivas corrientes de cola, a tres potenciales diferentes. **B.** Curva I-V construida con los valores máximos del componente temprano de  $I_{OD}$ . **C.** Curva I-V construida con los valores de  $I_{OD}$  al final del pulso de potencial. **D.** Corrientes de cola vs. potencial del prepulso.



La Fig. 10A muestra otra respuesta a la mezcla I, registrada en una neurona diferente. En este caso está también presente el comportamiento bifásico, siendo aparentemente mayor la contribución relativa de la componente temprana, representada en el gráfico 8B. La corriente neta al final del pulso de voltaje presenta una compleja dependencia del potencial (Fig. 10C), siendo negativa en todo el rango estudiado y alcanzando la magnitud máxima cerca de 0 mV. La curva I-V de las corrientes de cola es similar a las de las neuronas anteriores (Fig. 10D).

En la Fig. 11 se ilustra un tipo de respuesta observado en gran número de neuronas olfatorias durante el desarrollo de esta Tesis (ver detalles y estadística en sección III.A.1 de este capítulo) y cuyo estudio sistemático permitió comprender la razón de la variedad de comportamientos anteriormente ilustrados. La Figura 11A muestra la respuesta al pulso de odorantes excitatorios mientras el potencial de membrana es mantenido a 0 mV. El efecto del olor es la generación de una corriente de entrada de unos 80 pA, que permanece activa hasta el final del pulso despolarizante. Este comportamiento es similar al observado en los ejemplos anteriores a 0 mV, salvo que en este caso la corriente de cola al final del pulso de potencial **está ausente**. En la parte B se incluyen los registros de corriente obtenidos a 0, +30 y +50 mV, una vez restado el control; y en C se grafica la relación corriente-voltaje para estos y otros potenciales. Similarmente a lo que ocurre con la componente temprana de las células de las Figuras 9 y 10, el olor indujo una corriente de entrada cuya magnitud aumenta con el potencial. La relación I-V es aproximadamente lineal en el rango de potenciales estudiado y la corriente es cero para potenciales menores que -40 mV. Es importante destacar que a ningún voltaje se observaron corrientes de cola al retornar al potencial de mantención, lo que indica que la vía de transducción excitatoria no fue activada. Por otro lado, el signo de la corriente y la forma de la curva I-V tampoco corresponden a lo que se observa al activar la vía de transducción inhibitoria (Morales y cols., 1994).



**Figura 10. Corriente inducida por la mezcla I. (Ejemplo 3). A, B, C y D. Lo mismo que en la Fig. 9, pero en otra neurona olfatoria.**

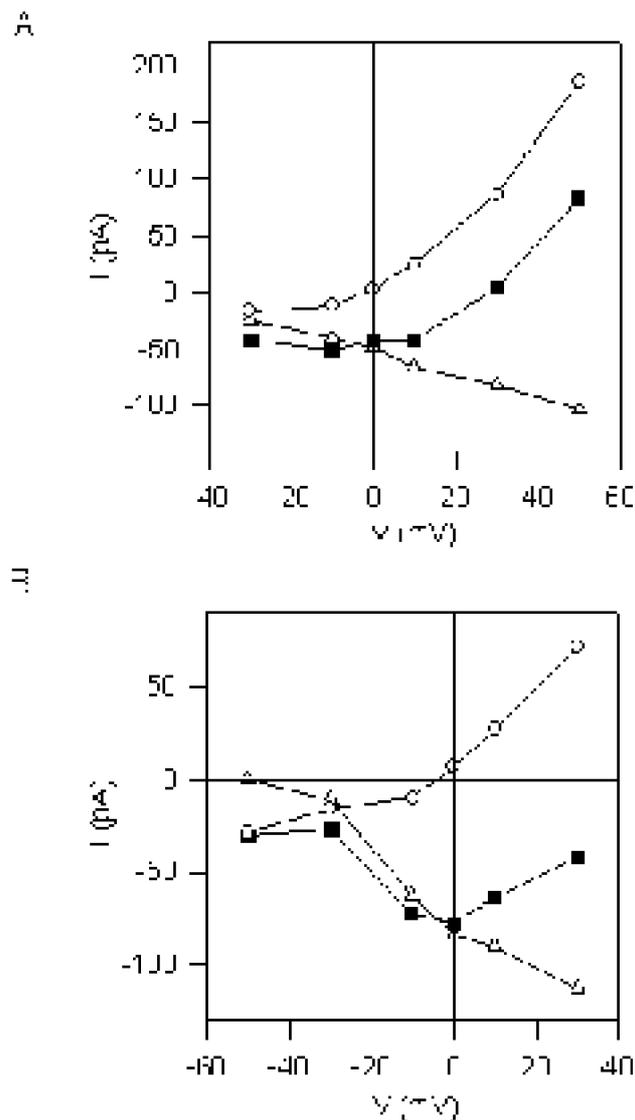
**FALTA FIGURA 11**

El análisis y comparación de los distintos tipos de respuestas ejemplificados por las neuronas de las Figuras 8 - 11, sugieren fuertemente que existirían dos mecanismos diferentes activados por el estímulo de olor, que pueden manifestarse con distinta intensidad relativa de célula en célula, dando origen a la diversidad de respuestas netas observadas. La similitud entre la relación I-V del efecto de la Fig. 11 y la correspondiente curva de la componente temprana en los casos en que hay corrientes bifásicas, indica que se trataría de un mismo efecto de los odorantes, que puede o no estar acompañado por la activación de la componente tardía. Como se mostrará más adelante, esta última corresponde a la corriente de transducción excitatoria.

En algunos casos, ambos efectos activados por el estímulo de olor pueden ser aislados y analizados separadamente en una misma célula, gracias a su diferente

latencia y curso temporal. En efecto, se ha señalado que la componente tardía de los registros a 0 mV en las Figuras 9 y 10 parece estar ausente, lo que permite apreciar en forma aislada la magnitud y el curso temporal de la componente temprana. En estos registros y en los de la Fig. 11, donde la componente tardía de la corriente neta está ausente para todos los potenciales, vemos que el máximo de la componente temprana se alcanza cerca del final del pulso de olor, siendo la recuperación de esta respuesta bastante mas lenta que su activación. La componente temprana está aún presente al final del pulso de potencial, donde se ha medido la magnitud graficada en la parte C de las Figuras 9 y 10 (corriente neta tardía). Esta observación y el hecho de que en estas dos neuronas la componente tardía comienza a desarrollarse en forma clara después de que la componente temprana alcanza su máximo, permite estimar el valor real de la componente tardía mediante la resta de las curvas en C y B. Estos resultados se muestran en la Fig. 12. La curva que resulta de la substracción (círculos vacíos) tiene, en ambas células, un comportamiento similar al de la relación I-V de la corriente de transducción excitatoria: es creciente, cambia de signo cerca de 0 mV, muestra rectificación para potenciales negativos. Por otro lado, la componente temprana no tiene asociada una corriente de cola al retornar al potencial de mantención (ver Fig. 11), de modo que las colas observadas en la parte D de los ejemplos 8, 9 y 10 se deben totalmente a la activación de la vía del AMPc, exhibiendo la dependencia de voltaje que ésta predice.

Como se mostrará en las secciones siguientes, este efecto temprano del olor corresponde a una **supresión inespecífica de las conductancias dependientes del potencial activadas por el pulso despolarizante**. La variedad de respuestas observadas resulta de la superposición de ambos efectos o, como en la Fig. 11, solamente de la supresión. Si bien la latencia del efecto supresivo es menor que la de la transducción, la probabilidad de observar comportamientos bifásicos aumenta cuando la magnitud de ambos efectos - en una célula determinada- es comparable y cuando la latencia de la corriente de transducción (que varía entre 0,3 y 1,5 s) es mayor que ~0,5 s. En el caso de la neurona de la Fig. 9, la supresión es pequeña en comparación con la corriente de transducción, lo que sumado a una latencia relativamente corta de esta última (» 0.4 s), produce un apantallamiento de la corriente de supresión. La presencia de la supresión es, sin embargo, responsable del corrimiento hacia la derecha de la curva I-V de la corriente neta. Más adelante, se detallará un método general que permite corregir el efecto de la supresión, independientemente de la magnitud relativa y el curso temporal de ambas componentes de la respuesta a olor.



**Figura 12. El componente tardío de  $I_{OD}$  es la corriente de transducción  $I_T$ .** A. Se reproducen las curvas I-V de las Figs. 9B y 9C, construidas con los valores máximos del componente temprano de  $I_{OD}$  ( $\Delta$ ) y con los valores de  $I_{OD}$  al final de cada pulso de potencial ( $\blacksquare$ ), respectivamente. Al restar estas dos curvas se obtiene la relación I-V del componente tardío de  $I_{OD}$  ( $\circ = \blacksquare - \Delta$ ). B. Lo mismo que en A, para la célula de la Fig. 10.

### III SUPRESIÓN DE LAS CORRIENTES DEPENDIENTES DEL POTENCIAL POR ODORANTES EN NEURONAS OLFATORIAS AISLADAS.

## A. Supresión de la corriente neta de salida ( $I_o$ )

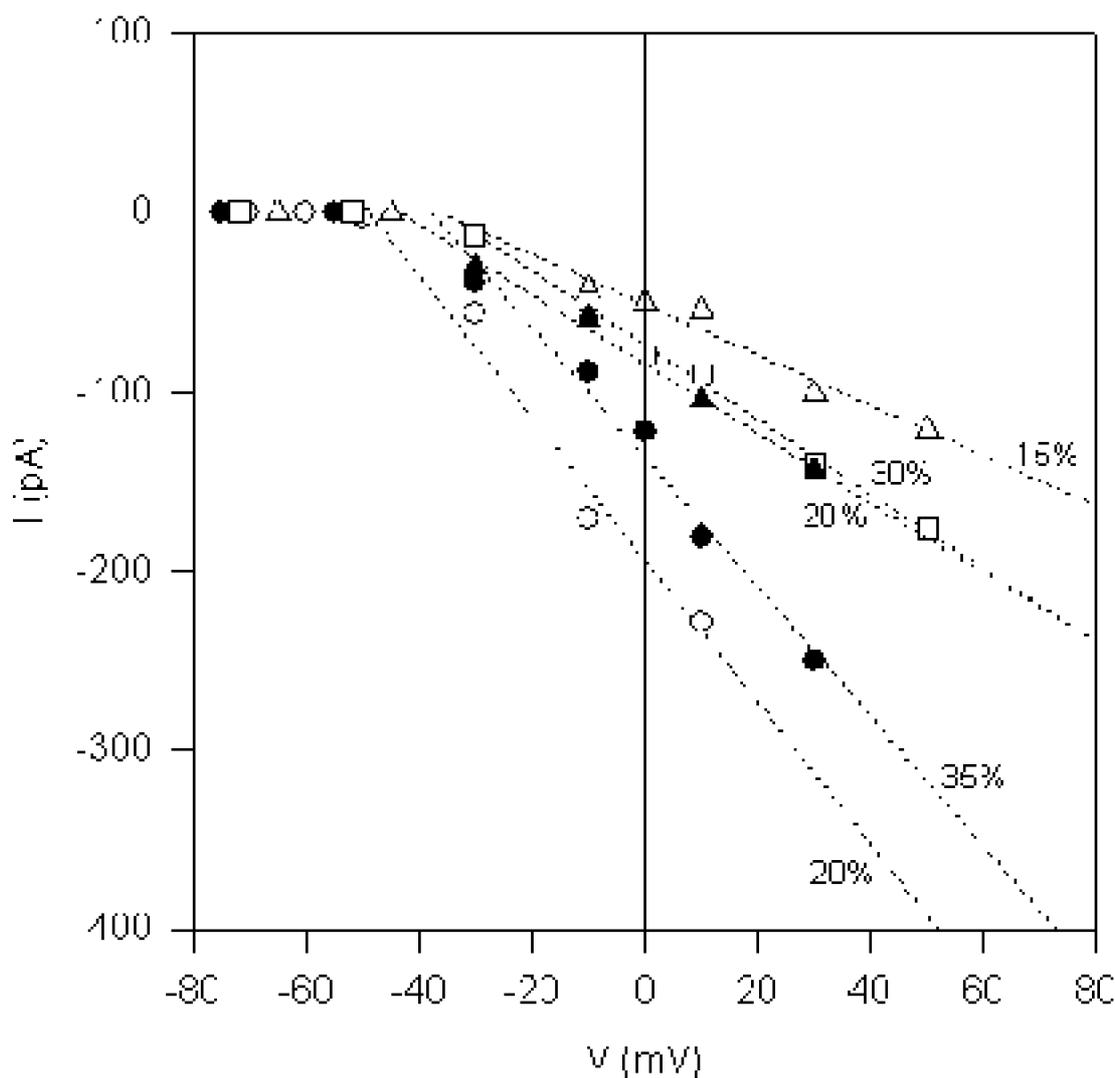
---

### 1. Características generales del fenómeno.

Como se vio en la sección anterior, se ha identificado un tipo de respuesta a olor aparentemente diferente de las respuestas de transducción conocidas hasta ahora. Para estudiar este fenómeno en forma aislada, se seleccionaron células que fuesen incapaces de quimiotransducir el estímulo de olor aplicado, utilizando como criterio la ausencia de corrientes de cola (ver Fig. 11). Los protocolos de estimulación utilizados en esta etapa fueron similares a los de las Figs. 8 - 11.

En células que no transducían los olores aplicados (ver Fig. 11) y siguiendo la convención corrientemente adoptada en el estudio de la respuesta a olor en V-controlado, se definió la *corriente de supresión*,  $I_S$ , como la diferencia entre la corriente total (generada por la despolarización y por el pulso de olor) y la corriente activada por la despolarización en ausencia del olor ( $I_o$ : control con Ringer). Es decir, en células que no transducen,  $I_{OD} = I_S$ . Esta es una definición operacional, que resulta útil para caracterizar el efecto y estudiar el mecanismo que lo genera. La elección del término *supresión* se basa en los resultados que se exponen a continuación.

Se investigó la dependencia de potencial de  $I_S$  en 12 neuronas olfatorias, construyéndose - en cada caso- la relación I-V con el valor de  $I_S$  en el punto de máximo efecto. Por claridad, en la Fig. 13 se han incluido sólo 5 ejemplos representativos. Si bien la magnitud del efecto varió de una célula a otra, en todos los casos la curva I-V de la corriente  $I_S$  pudo ser ajustada a una línea recta, para potenciales entre un cierto valor mínimo ( $V_{min}$ ) y el valor máximo del rango explorado (+30 ó +50 mV), similarmente a lo ocurrido con la neurona de la Fig. 11. Para potenciales menores que  $V_{min}$ , tanto  $I_o$  como  $I_S$  fueron cero en todas las neuronas.  $V_{min}$  varió entre una célula y otra, tomando valores entre -60 y -22 mV, con un promedio de  $(-39 \pm 11)$  mV (promedio  $\pm$  D.E.).



**Figura 13. Relación I-V de la corriente de supresión ( $I_S$ ).** Curvas I-V de la corriente  $I_S$  correspondientes a 5 células diferentes, representativas de un total de doce. El valor promedio del potencial a partir del cual  $I_S$  deja de ser cero es  $V_{min} = -39 \pm 11$  mV (promedio  $\pm$  D.E.). El porcentaje de supresión de  $I_0$  se indica junto a cada curva.

La relación corriente-voltaje de  $I_S$  difiere substancialmente de la curvas I-V de las corrientes de transducción excitatoria e inhibitoria y tampoco corresponde a ninguna de las curvas I-V asociadas a las diferentes corrientes activadas por el potencial presentes en las neuronas olfatorias de *C. caudiverbera*. En las condiciones iónicas de nuestros experimentos, la corriente  $I_S$  **no puede ser explicada en términos de la apertura de canales en la membrana celular**. Por el contrario, un comportamiento como el descrito es consistente con **la disminución** de las conductancias de potasio responsables de la corriente de salida. El hecho de que el potencial  $V_{min}$  a partir del cual la corriente  $I_S$  comienza a observarse coincida con el umbral de activación de la corriente de salida, es también consistente con esta interpretación. Otra evidencia en este sentido es que la magnitud de  $I_S$  nunca superó a la de  $I_0$ , representando siempre una fracción de ésta.

Adicionalmente, la linealidad de la relación I-V de  $I_S$  en el rango estudiado parece ser un reflejo de la dependencia lineal respecto del potencial exhibida por  $I_O$  en el mismo rango (ver Fig. 3).

El porcentaje de supresión de la corriente  $I_O$  en las neuronas de la Fig. 13 se indica a un costado de cada recta. Como vemos, la magnitud del efecto varía de una célula a otra. Esta variación se debe a diferencias en la concentración de odorantes utilizada en cada caso, a diferencias en la magnitud de  $I_O$  y a factores geométricos que serán detallados más adelante.

En la Introducción se señaló que la aplicación crónica de odorantes en el medio que baña a las neuronas olfatorias produce una supresión inespecífica y reversible de las corrientes voltaje-dependientes (Kawai y cols., 1997). Sin embargo, los resultados mostrados en esta Tesis indican que es posible inducir esta supresión en respuesta a pulsos de olor de duración y concentración similar a los utilizados para estudiar la transducción. Este hecho no ha sido reportado hasta ahora y sugiere una participación de la supresión en la respuesta fisiológica a los olores.

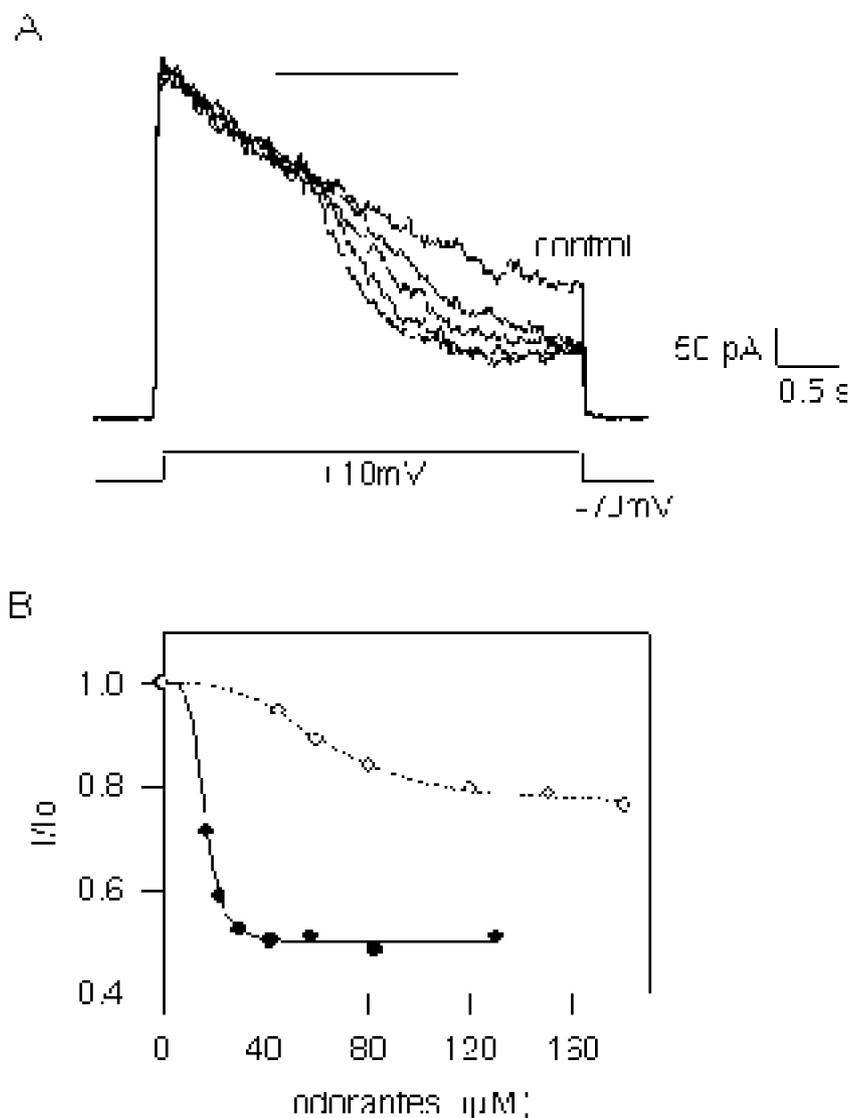
En la dendrita de las neuronas olfatorias de vertebrados se ha detectado la existencia de un intercambiador de  $Na^+ - Ca^{2+}$  electrogénico (estequiometría 3:1; Lischka y Schild, 1993). Con el objetivo de descartar la participación del intercambiador en la generación de las respuestas a olor estudiadas, se realizó un experimento en que el sodio de la solución externa fue reemplazado por litio. El ion litio no es reconocido por el intercambiador, de modo que si este último fuese el responsable de la generación del efecto estudiado, uno esperaría que las respuestas a odorantes - disueltos en solución externa con litio- desaparecieran. El litio permea por los canales de sodio de modo que tanto la forma de las corrientes voltaje-dependientes como la actividad espontánea de las células, permanecieron inalteradas. Bajo estas condiciones, las corrientes de supresión siguieron estando presentes ( $n = 4$ ), permaneciendo inalterada su relación I-V (no se muestra), lo que descarta que este tipo de respuesta a olor se deba a la acción del intercambiador.

Una característica relevante de la corriente  $I_S$  es que ésta se encuentra presente en casi todas las neuronas olfatorias estudiadas (94%,  $n = 121$ ), observándose tanto en forma aislada como superpuesta a las corrientes de transducción. Puesto que todas las células receptoras están dotadas del mismo conjunto de canales dependientes del potencial - aunque en proporciones variables-, esta universalidad del fenómeno es consistente con la interpretación de que se trataría de un efecto de los odorantes sobre estas conductancias. Otro aspecto que vale la pena destacar es que si la despolarización se realiza durante o inmediatamente después de la aplicación del estímulo de olor, la corriente  $I_O$  activada presenta ya la supresión respecto del control, lo que indica que no es necesario que los canales estén abiertos para ser suprimidos. Más adelante se mostrará evidencia que sugiere fuertemente que este efecto sobre los canales es directo e independiente del proceso de transducción.

## **2. Relación concentración-respuesta de la supresión.**

En cada célula, la magnitud de la respuesta supresiva dependió de la concentración de

odorantes utilizada. La Figura 14A muestra una familia de corrientes activadas por pulsos idénticos de voltaje desde  $-70 \text{ mV}$  ( $V_{\text{Mant}}$ ) a  $-10 \text{ mV}$ , cada una asociada a un estímulo de olor (mezcla I) de diferente intensidad, incluyendo un control con solución Ringer. La relación concentración-respuesta correspondiente a este experimento se presenta en la Fig. 14B (círculos llenos). En esta neurona, concentraciones de odorantes  $\geq 40 \mu\text{M}$  produjeron una supresión máxima de un 50% de  $I_{\text{O}}$ . Las concentraciones a partir de las cuales los odorantes de la mezcla I comenzaban a inducir supresión variaron de una célula a otra, tomando valores entre 5 y  $40 \mu\text{M}$ . El porcentaje de la corriente  $I_{\text{O}}$  suprimido por dichos odorantes varió ampliamente, virtualmente entre 0 y 100%, medido en la situación de máxima supresión. En la mayoría de los casos, la supresión alcanzó valores intermedios. La Fig. 14B incluye otro ejemplo, de una célula diferente, para ilustrar esta variabilidad (círculos vacíos). En este caso, la máxima supresión fue del 25%, para concentraciones  $\geq 120 \mu\text{M}$ .



**Figura 14. Relación concentración-respuesta de la supresión de  $I_{\text{O}}$ .** A. La familia de corrientes muestra la supresión de  $I_{\text{O}}$  inducida por estímulos de olor de concentración

creciente (obtenida al incrementar la presión en la pipeta de estímulo). **B.** Curva de dosis-respuesta construida con el valor de la corriente relativa  $I/I_0$  ( $I = I_0 - I_S$ ) en el punto de máximo efecto ( $I$ ). Los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación de Hill  $I/I_0 = (1 - \text{min}) / (1 + C/I_{50})^n + \text{min}$ , donde  $I_{50} = 17 \mu\text{M}$ ,  $n = 5,5$ ,  $\text{min} = 0,51$  ( $\text{min} = \text{valor asintótico de } I/I_0 \text{ debido a la supresión}$ ). Otro ejemplo está representado por la línea punteada (**O**;  $I_{50} = 64 \mu\text{M}$ ;  $n = 3,2$ ;  $\text{min} = 0,75$ ).

Independientemente de la variabilidad observada, cuyas posibles causas serán discutidas más adelante, los estudios de dosis-supresión indican que el rango de concentraciones en que se produce la supresión coincide con aquel en que las neuronas olfatorias aisladas transducen los estímulos de olor. De hecho, ya hemos presentado algunos ejemplos en que se observan respuestas de transducción y supresión sobrepuestas (ver Figs. 8 - 10). Por lo tanto, en aquellos protocolos experimentales comúnmente utilizados para estudiar transducción olfatoria que - como el nuestro - permiten el acceso de los odorantes a toda la superficie celular, resulta indispensable considerar posibles contribuciones de la supresión a las respuestas a olor. En estos casos, si se desea obtener la corriente de transducción en forma aislada es necesario corregir el efecto de la supresión.

### **3. Corrección del efecto de supresión: método general (método II).**

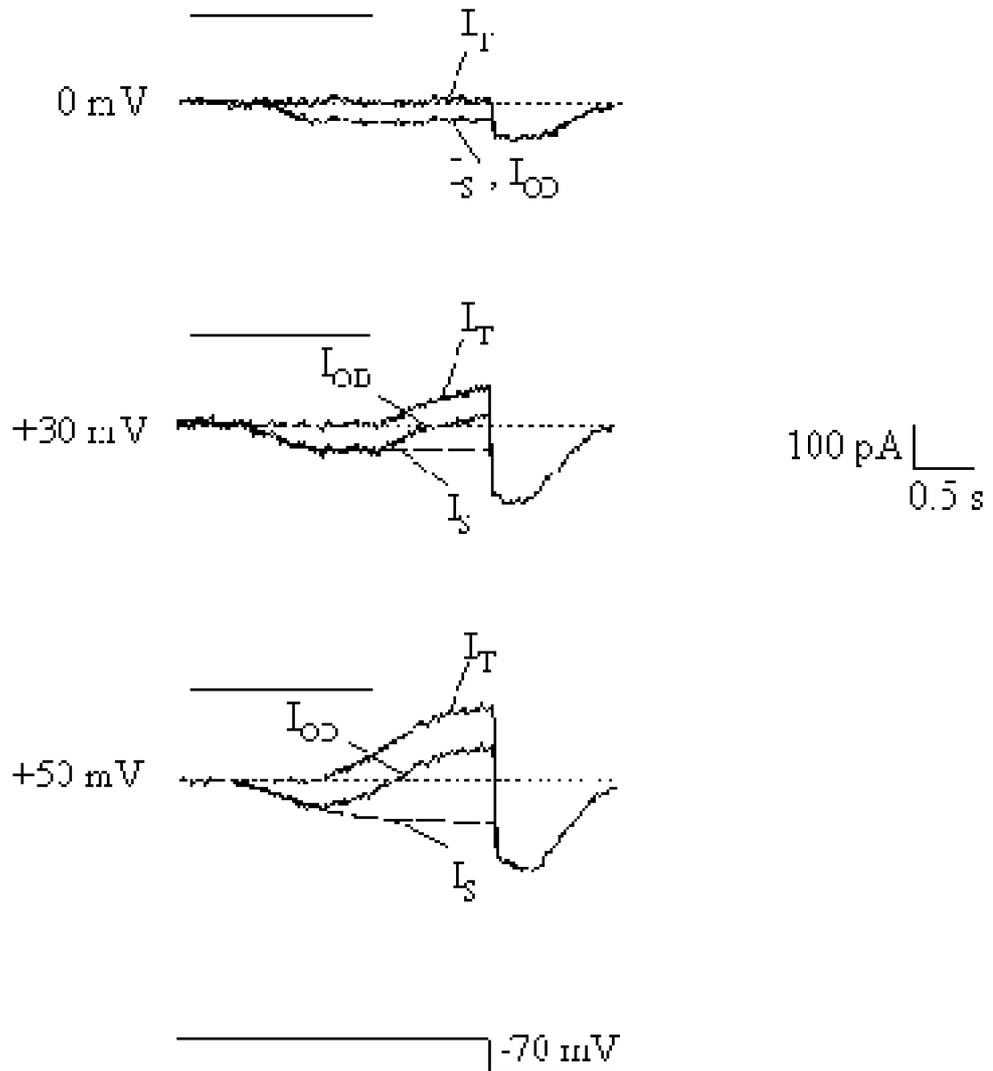
En la sección II de los Resultados se corrigieron las curvas I-V de la respuesta neta inducida por el olor, mediante la substracción de la corriente  $I_S$  medida directamente de los registros. Este método (método I) permite obtener la curva I-V de la corriente de transducción ( $I_T$ ) en aquellos casos en que los cursos temporales de ambas respuestas a olor son suficientemente diferentes como para que las dos componentes puedan ser claramente distinguidas. En la presente sección, propondremos un método de uso más general (método II) que permitirá estimar la amplitud de la corriente de supresión y corregir su efecto sobre la corriente neta inducida por el olor, independientemente de la magnitud relativa y curso temporal de ambas componentes. Para esto haremos uso del hecho de que la curva I-V de la supresión puede ser aproximada a una recta (en un rango de potenciales apropiado) que corta al eje horizontal en un potencial  $V = V_{\text{min}}$ , cuyo valor será aproximado por el promedio experimental de  $-39 \text{ mV}$  (ver sección 1). La pendiente de la recta variará de una célula a la otra y podrá estimarse en cada caso midiendo el valor de la respuesta a olor a  $0 \text{ mV}$ , potencial en el que la corriente neta será igual a  $I_S$  (por tratarse del potencial de inversión de la corriente de transducción).

Los gráficos de la Figura 15 A, B y C muestran los resultados de la aplicación de este método de corrección a las curvas corriente-voltaje de las Figuras 8, 9 y 10, respectivamente. En cada caso se muestra la curva I-V de la respuesta neta ( $I_{\text{OD}}$ , círculos llenos) y la curva I-V de la corriente de transducción (círculos vacíos) obtenida luego de corregir la curva experimental utilizando el método general (método II). En los gráficos B y C se ha incluido también la corrección realizada en la sección II (método I, cuadrados; ver Fig. 12) con la finalidad de comparar ambos resultados. Analicemos, en primer lugar, la forma de las curvas experimentales obtenidas en cada uno de estos tres ejemplos. En el caso de la neurona en A (ver Fig. 8), las cinéticas de  $I_S$  e  $I_T$  no son substancialmente diferentes y la magnitud de  $I_T$  es -en general- mayor que la de  $I_S$ , de

modo que la corriente de supresión es apantallada por la corriente de transducción, salvo a 0 mV, donde  $I_T$  se anula; la curva I-V neta aparece desplazada hacia la derecha, sin presentar una mayor distorsión en su forma. La curva experimental en B, sin embargo, muestra un desplazamiento mucho más pronunciado, debido a que la magnitud de  $I_S$  es similar a la de  $I_T$  (ver Fig. 9). Por último, en el caso C la curva I-V de la corriente neta activada por el olor muestra un alto grado de distorsión (sin cambiar de signo en todo el intervalo de potencial estudiado). Esta alteración tan radical de la curva I-V se debe a que en esta neurona la magnitud de  $I_S$  es mayor que la de  $I_T$  para casi todos los potenciales (ver Fig. 10). Respecto a la corrección de la supresión, se ve que la aplicación del método general permitió, en los tres casos, la obtención de una curva I-V característica de la corriente de transducción excitatoria; independientemente de la magnitud relativa y curso temporal de las dos componentes de la corriente neta. Los gráficos B y C - correspondientes a las neuronas de las Figs. 9 y 10, donde la cinética notoriamente diferente de  $I_S$  e  $I_T$  permitió su distinción y cuantificación (método I)- nos permiten poner a prueba la validez de nuestro método general. En B, ambos métodos dieron resultados virtualmente idénticos, mientras que en C, los dos procedimientos dan valores levemente diferentes sólo en los dos puntos correspondientes a los potenciales más positivos. Esta pequeña diferencia puede ser atribuida principalmente al decaimiento (*rundown*) de las corrientes dependientes del potencial, que en esta célula en particular fue mayor que lo usual. Los valores positivos fueron principalmente afectados por haber sido tomados al final del experimento, cuando el efecto del decaimiento era más pronunciado.

En conclusión, los resultados indican que sin importar cuán anómala sea la relación I-V de las corrientes inducidas por olor, su forma y potencial de inversión se aproximan claramente a los de la transducción, luego de corregir el efecto de la supresión por cualquiera de los dos métodos, siendo el método II de uso más general.

En la Fig. 16 (mismos registros que en la Fig. 9A) se muestra un ejemplo en que se han aislado ambas componentes de la respuesta a olor ( $I_{OD}$ ) en función del tiempo. En aquellas células que sólo respondieron al olor con supresión se observó que el desarrollo temporal de  $I_S$  podía ser aproximado por una función de Boltzmann. En la Fig. 16 (arriba) puede comprobarse la validez de este ajuste pues en este caso  $I_{OD} = I_S$  ( $V = 0$  mV). En los registros del centro y abajo (+30 y +50 mV, respectivamente) se ha extrapolado la función de ajuste hasta el final del pulso de potencial, obteniéndose la corriente  $I_T$  en forma aislada, luego de restar la componente de supresión a la corriente neta.



**Figura 16. Descomposición de la corriente inducida por olor en sus dos componentes.** En los registros de la Fig. 9 se han aislado los componentes  $I_S$  e  $I_T$  de la corriente neta inducida por el olor ( $I_{OD}$ ), en función del tiempo. A 0 mV (**arriba**)  $I_S$  coincide con  $I_{OD}$  y ha sido ajustada a una función de Boltzmann (línea quebrada,  $I_S = A/(1 + B \exp(t/q))$ ,  $A = 39$  pA,  $q = 85$  ms,  $B = 0,02$  pA). La misma función predice la dependencia temporal de  $I_S$  para otros dos potenciales (+30 mV:  $A = 72$  pA,  $q = 141$  ms,  $B = 0,03$  pA, **al centro**; +50 mV:  $A = 112$  pA,  $q = 283$  ms,  $B = 0,18$  pA, **abajo**).

## B. La supresión es independiente de la quimiotransducción.

En las secciones anteriores se mostró que el fenómeno en estudio es **diferente** del efecto excitatorio y que la evidencia indica que se trataría de una supresión de las corrientes activadas por el potencial. Además de aportar más evidencias en favor de la última afirmación, en esta sección se mostrará que el mecanismo responsable de este efecto de los olores es **independiente** de las vías de transducción.

## 1. La supresión es un fenómeno inespecífico.

Como se mencionó, el efecto supresivo está presente virtualmente en todas las neuronas olfatorias estimuladas con la mezcla I (94%,  $n = 121$ ). Esta falta de selectividad contrasta con la especificidad que caracteriza a las vías de transducción olfatoria. En *C. caudiverbera* la activación de las vías excitatoria o inhibitoria - al estimular con la mezcla I o II- se observa en el 35 y 36% de las neuronas, respectivamente (Morales, 1995). En estos casos, la puesta en marcha de los mecanismos de transducción vía segundos mensajeros requiere de la unión de las moléculas odorantes a receptores específicos ubicados en la membrana de los cilios olfatorios. Consistentemente, no se han observado hasta ahora corrientes de transducción en neuronas que han perdido sus cilios durante el procedimiento de disociación. Por el contrario, en este trabajo, **las respuestas supresivas estaban también presentes en células sin cilios**. Estos resultados sugieren que la supresión es independiente de las cascadas de transducción.

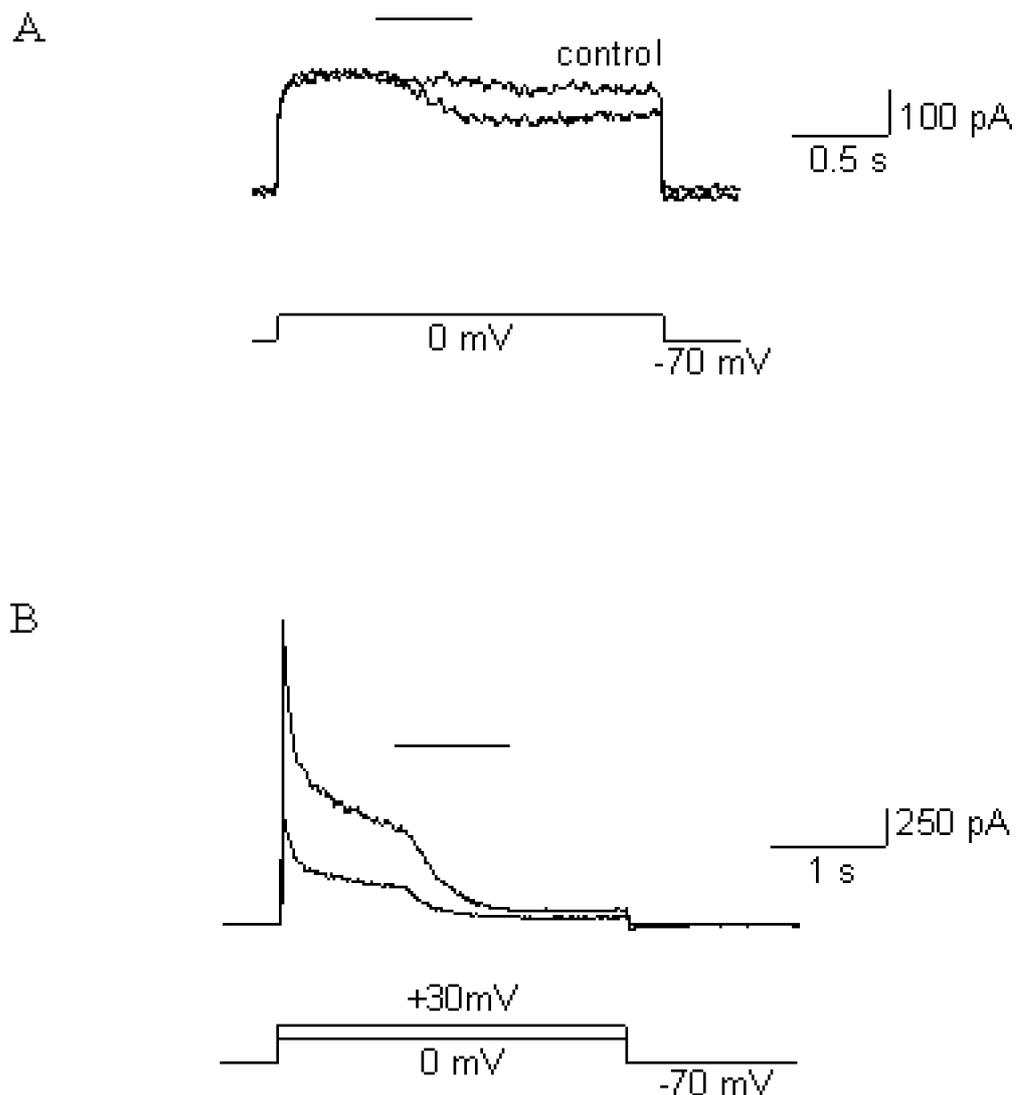
Una evidencia que amplía el carácter inespecífico de la supresión está dada por el hecho de que  $I_S$  no sólo es activada por odorantes florales y frutales (mezcla I) sino también por olores pútridos. La Fig. 17A muestra un ejemplo de la supresión causada por un estímulo de olores pútridos (mezcla II), que no presenta diferencias aparentes con la supresión generada por la mezcla I. Sin embargo, las corrientes de supresión generadas por la mezcla II fueron - en general - de menor magnitud que las observadas al estimular con concentraciones similares de la mezcla I.

Por otro lado, como se muestra en la Fig. 17B, también es posible observar supresión por olores en neuronas olfatorias aisladas de rata. En este ejemplo, pulsos despolarizantes desde -70 mV hasta 0 mV o +30 mV indujeron una gran corriente de salida transitoria (Lynch y Barry, 1991) - ausente en el sapo chileno- seguida por la corriente de salida de decaimiento lento. El estímulo de olor (mezcla II, en este caso) produjo una reducción de la corriente de salida de ~60%, de una manera virtualmente idéntica que en el sapo ( $n = 26$ ). La mezcla I produjo efectos supresivos similares ( $n = 40$ , no se incluye).

El hecho de que la supresión sea inducida por odorantes de diversa naturaleza y que ésta también se observe en neuronas olfatorias de la rata al estimular con las mismas mezclas de olores, respalda la noción de que la supresión es un efecto inespecífico de los odorantes sobre los canales activados por el potencial.

## 2. Localización de la supresión.

Como se ha señalado anteriormente, en los cilios olfatorios ocurre la parte principal - o la totalidad- de los procesos involucrados en la quimiotransducción, desde la unión de las moléculas odorantes a los receptores ciliares hasta la apertura de las conductancias que generan la respuesta eléctrica. Consistentemente con esto, en experimentos de estimulación con odorantes en forma localizada sobre distintas zonas de una neurona olfatoria, las respuestas de transducción mayores y más rápidas se obtienen al estimular localmente la región de los cilios (Lowe y Gold, 1991; Morales y cols., 1994).

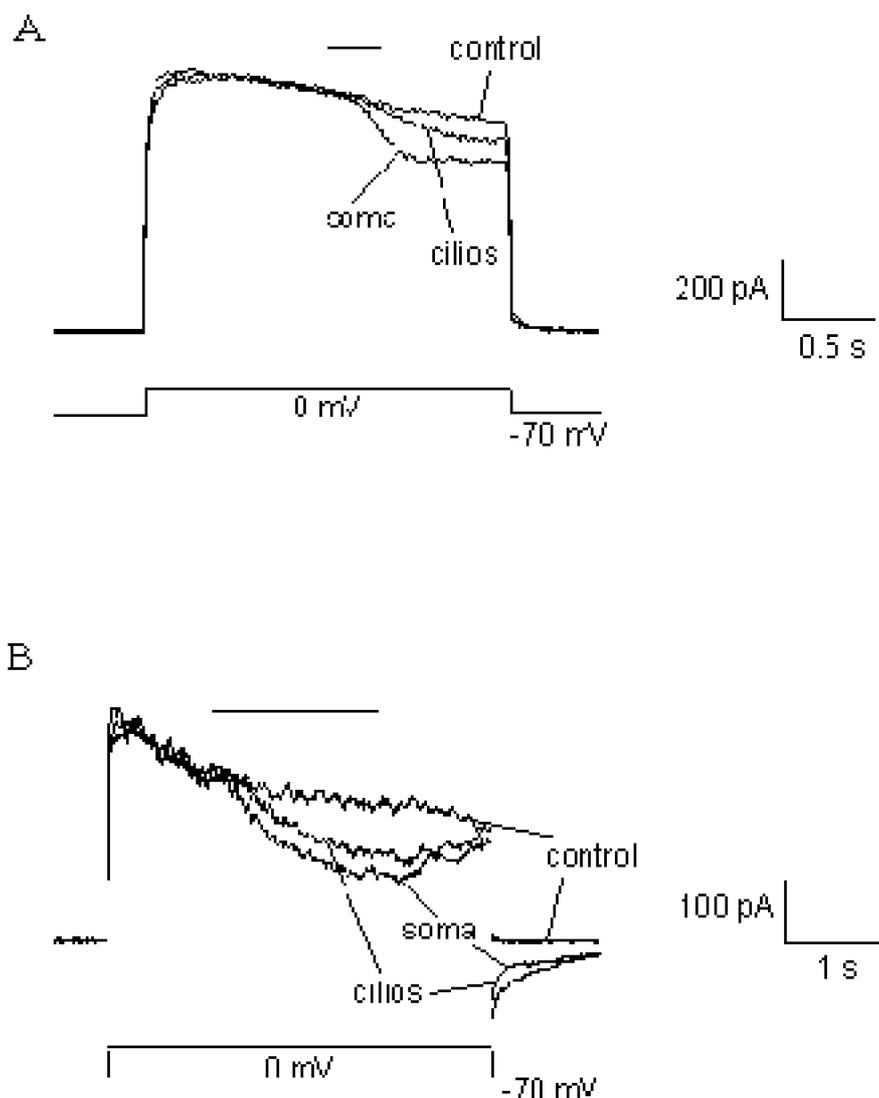


**Figura 17. Supresión por la mezcla II en neuronas olfatorias de *Caudiverbera* y de la rata. A.** Supresión inducida por odorantes pútridos en una neurona olfatoria del sapo. Control: estimulación con un pulso de Ringer. **B.** Se presentan en forma superpuesta dos registros realizados en una neurona olfatoria de rata (a 0 mV y +30 mV), en los que se muestra la supresión generada por odorantes de la mezcla II.

Se ha mencionado que el efecto de supresión está presente en todas las neuronas olfatorias, independientemente de la presencia de los cilios. Sin embargo, considerando la posibilidad de que parte de la maquinaria de transducción pudiese residir en el botón dendrítico, o simplemente que existieran cilios que no hayan sido visibles, se realizaron experimentos de estimulación localizada ( $n = 4$ ) para estudiar el mecanismo que subyace a la supresión y descartar que la generación del efecto requiera de algunas de las etapas iniciales de la transducción.

La Fig. 18A muestra la respuesta a pulsos de olor idénticos aplicados en forma localizada en la zona de los cilios y posteriormente en el soma de una neurona olfatoria (con 4 ó 5 cilios, de unos 20  $\mu$ m de largo), en la que la distancia entre el botón dendrítico

y el soma era de 40 – 50  $\mu\text{m}$ . El registro muestra la supresión de la corriente neta  $I_o$  activada por un pulso de potencial de 0mV ( $V_{\text{mant}} = -70 \text{ mV}$ ) al estimular - desde la misma distancia- la zona de los cilios y luego el soma. El voltaje al cual se realizó el experimento (0 mV), se escogió por tratarse del potencial de inversión de la corriente excitatoria, de modo que - en caso de existir- esta corriente no afecte la medición de la supresión. La ausencia de una corriente de cola indica que esta célula no quimiotransducía el estímulo aplicado. Los odorantes (mezcla I) generaron una corriente de supresión de 75 pA (8%), cuando la aplicación se realizó sobre los cilios y de 150 pA (20%) cuando se estimuló el soma. Probablemente, la supresión observada al estimular los cilios se debió a los odorantes que difundieron hacia el cuerpo celular. La mayor latencia y curso temporal más lento registrados en este caso respaldan esta interpretación. Este resultado es contrario a lo que se esperaría si la supresión fuese un efecto sobre los canales de transducción o sobre cualquiera de los componentes anteriores de la cascada.



**Figura 18. Localización de la supresión. A.** En forma superpuesta se muestra la

*supresión inducida en una neurona incapaz de transducir la mezcla I, estimulada localmente en la región de los cilios y posteriormente en el soma, durante una despolarización a 0 mV. B. Un experimento similar realizado en una neurona que sí transducía el estímulo de olor. Controles: estimulación con Ringer.*

Un segundo ejemplo se muestra en la Fig. 18B, donde se utilizó el mismo protocolo de estimulación en otra neurona de características geométricas similares, pero capaz de transducir los odorantes de la mezcla I (nótese la corriente de cola al retornar al potencial de mantención). En este caso, al estimular la región de los cilios se observó una supresión unos 80 pA mientras que la posterior estimulación del soma aumentó el efecto hasta unos 120 pA; por el contrario y como era de esperar, la magnitud de la corriente de transducción es mayor al localizar el estímulo cerca de los cilios, como lo indica el mayor tamaño de la corriente de cola.

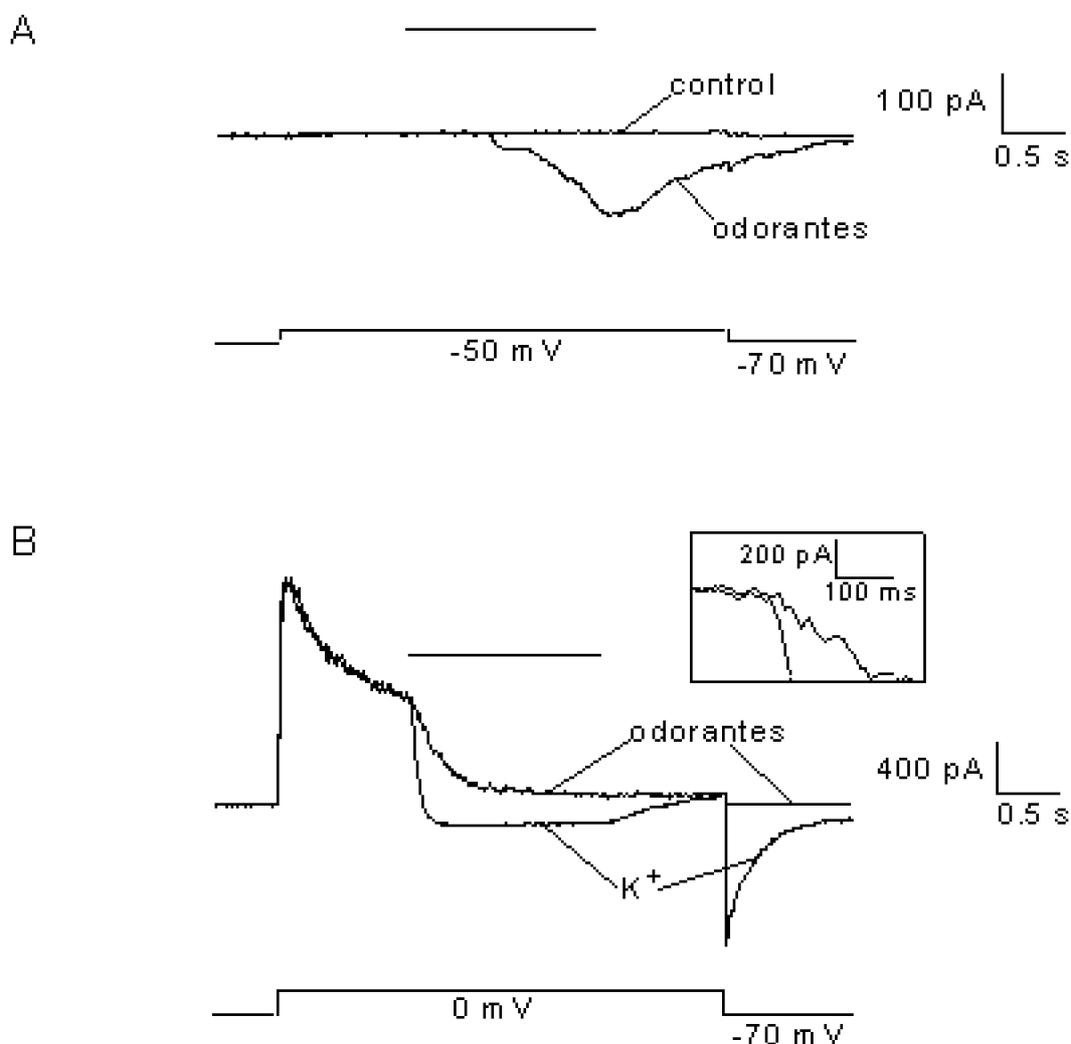
### **3. Latencia de la supresión**

En el caso de la activación de la vía de transducción excitatoria, se ha encontrado que el tiempo que transcurre entre la aplicación del pulso de olor y el desarrollo de la corriente de transducción (latencia) es de centenas de milisegundos. Tal latencia es consistente con la idea de la participación de mensajeros secundarios -en este caso el AMPc- en el proceso que culmina con la apertura de las conductancias de transducción. En *C. caudiverbera*, la latencia del efecto excitatorio ha mostrado cierta variabilidad dependiendo de la intensidad del estímulo aplicado, obteniéndose valores entre 300 y 900 ms para pulsos prolongados (> 2 s) y superiores a 1 s para estímulos cortos (<100 ms), manteniéndose constante la distancia y presión (Morales, 1995). En el mismo estudio, las latencias de las respuestas inhibitorias activadas por olores pútridos, oscilaron en el rango de 167 ms para pulsos prolongados (2.5 s) y 400 ms para pulsos de corta duración (500 ms). Durante el desarrollo de esta Tesis, se obtuvieron valores similares. En la Fig. 19A se muestra un ejemplo representativo de la corriente de transducción  $I_T$  activada por un pulso de la mezcla I a un potencial en que las corrientes  $I_S$  e  $I_O$  son despreciables (-50 mV). La latencia de  $I_T$  es, en este caso, de 560 ms.

La latencia del efecto supresivo mostró también cierto grado de variabilidad, dependiendo de la distancia a la que se aplicaba el estímulo, su duración y la presión del pulso. Dichas variables determinan la concentración de odorantes que existirá cerca de la célula al final de cada pulso, pudiéndose estimar este valor en cada configuración, mediante la técnica desarrollada en la sección Métodos. Ahora, no sólo la concentración final a nivel de la célula puede variar, sino también la rapidez con que este valor se alcanza. Esto puede apreciarse al observar las curvas de despolarización por pulsos de solución alta en potasio (Fig. 2A, sección Métodos); donde, al aplicar pulsos de presión creciente, a 40  $\mu\text{m}$  de distancia, el tiempo necesario para alcanzar una concentración capaz de generar una corriente de  $\text{K}^+$  observable (latencia) es mayor mientras menor sea la presión del estímulo. Como se puede apreciar en la Fig. 14, lo mismo ocurre con la latencia de la supresión al aplicar estímulos de intensidad variable.

Por lo señalado anteriormente, los esfuerzos se centraron en determinar el valor **mínimo** de la latencia de la supresión, que es lo que - en definitiva- puede entregar

información respecto del mecanismo involucrado. Para esto se aplicaron pulsos de 1,5 s, a 20  $\mu\text{m}$  de distancia y utilizando altas presiones (12 - 14 psi). Con el fin de estimar el tiempo de difusión de las moléculas del estímulo a través del medio extracelular, se comparó la latencia del efecto supresivo con la latencia de la despolarización por potasio. Para esto, se utilizaron pipetas de estímulo dobles, que contenían olor en solución externa normal en un cañón y solución alta en potasio (100 mM, ver Tabla 1) en el otro; y se aplicaron pulsos idénticos sobre la misma célula. Un ejemplo representativo de este experimento ( $n = 15$ ) se muestra en la Figura 19B. Los tiempos transcurridos desde el comienzo del estímulo hasta la aparición de la respuesta eléctrica fueron muy similares en ambos casos: la despolarización por el pulso de potasio demoró unos 10 ms - valor similar al obtenido en el reporte original de Firestein y Werblin, 1989- mientras que para el efecto de supresión se midió un retardo de aproximadamente 30 ms. Restando la latencia del efecto del potasio, estimamos el valor de la latencia de la supresión en unos 20 ms. En 15 experimentos en que se utilizó el mismo protocolo, se encontraron resultados similares, con una latencia promedio de  $19 \pm 13$  ms (promedio  $\pm$  D.E.).



**Figura 19. Latencias de las corrientes de transducción y supresión. A. Registro representativo de la corriente de transducción activada por la mezcla I. Latencia = 560 ms.**

*B. Comparación de las latencias de la supresión por olor (mezcla I) y de la corriente generada por un pulso de Ringer alto en  $K^+$  (100 mM), en otra neurona olfatoria. Los estímulos fueron aplicados mediante una pipeta doble sobre el cuerpo celular. El inserto muestra un detalle de estas dos corrientes; la flecha indica el comienzo de los estímulos. Las latencias fueron de 10 ms y 30 ms para los estímulos de  $K^+$  y olor, respectivamente.*

La rapidez del mecanismo responsable de la supresión de las corrientes activadas por el potencial contrasta con los cientos de milisegundos que toma la generación de las respuestas excitatorias e inhibitorias. Esto constituye un argumento más en favor de la independencia entre la supresión y la quimiotransducción, sugiriendo, además, que se trataría de un efecto directo de las moléculas de olor sobre los canales voltage-dependientes.

#### **4. Permanencia de la supresión.**

Otra distinción importante entre transducción y supresión es que las corrientes de transducción exhiben un decaimiento hasta eventualmente desaparecer, en tanto que las corrientes de supresión están presentes mientras las corrientes dependientes del potencial lo estén. Si bien las corrientes voltaje-dependientes son susceptibles de decaer, este efecto es mucho menos pronunciado. En células que transducían los olores utilizados,  $I_T$  usualmente podía observarse durante todo el tiempo que duraba un experimento promedio (unos 20 min), aunque al cabo de ese tiempo su magnitud se había reducido típicamente en un 50% - 75%. En algunos casos se pudo apreciar la desaparición completa de la corriente de transducción, mientras las corrientes dependientes del potencial mostraban una disminución de un 20% - 30%. Esto se observó principalmente en experimentos en que fue posible mantener la condición de célula completa durante más tiempo (desde unos 40 min hasta más de una hora). La menor sensibilidad de  $I_S$  al decaimiento, comparado con  $I_T$ , es consistente con la noción de que  $I_S$  no es dependiente de segundos mensajeros, contrariamente a  $I_T$ .

### **C. Las cuatro conductancias dependientes del potencial son suprimidas por pulsos breves de olor.**

---

En las secciones anteriores se ha mostrado que la corriente neta de salida  $I_O$  es susceptible de ser bloqueada por pulsos cortos de olor. Utilizando agentes farmacológicos y el reemplazo de iones (ver sección I.B.1), se estudió la posible acción supresiva de los odorantes sobre las diferentes conductancias voltaje-dependientes.

#### **1. Corrientes de potasio.**

La corriente neta de potasio ( $I_O$ ) está constituida por una componente tipo rectificador tardío ( $I_{KV}$ ) y otra dependiente de calcio ( $I_{KCa}$ ). Como se mostró en la sección I B.1 de este capítulo, la perfusión del baño con solución Ringer 0- $Ca^{++}$  (ver Tabla I) permite eliminar - o disminuir significativamente- esta última componente. En la Figura 20A se muestran en forma superpuesta las corrientes inducidas en una célula por un pulso de

potencial de  $-70$  mV a  $+30$  mV, bajo Ringer normal y bajo Ringer  $0\text{-Ca}^{++}$ . Las curvas I-V de las familias de corrientes medidas al final de diferentes pulsos de voltaje (en la misma célula) se presentan en la parte B (Ringer normal: círculos llenos; Ringer  $0\text{-Ca}^{++}$ : círculos vacíos). En esta célula, la supresión de  $I_o$  bajo Ringer normal fue de  $700$  pA (Fig. 20C). Durante la exposición a Ringer  $0\text{-Ca}^{++}$  pudimos medir la supresión de  $I_{KV}$  en forma aislada, estimulando con los odorantes diluidos en esa misma solución externa. Esta componente de la corriente de salida fue suprimida en  $500$  pA (Fig. 20C). Si se ignora el posible decaimiento de las corrientes, la diferencia entre la supresión de  $I_o$  y la supresión de  $I_{KV}$ , corresponde a la supresión de  $I_{KCa}$ ; de modo que para esta célula la supresión de  $I_{KV}$  corresponde a  $\sim 70\%$  de la supresión de la corriente neta total, correspondiendo el otro  $\sim 30\%$  a la supresión de  $I_{KCa}$ . Se obtuvieron resultados similares en otras cuatro neuronas, si bien tanto los porcentajes de supresión como la contribución relativa de cada componente a la corriente neta  $I_o$  fueron diferentes en cada caso. La Fig. 20D muestra un caso extremo en que los olores suprimieron completamente la corriente de salida bajo ambas condiciones, indicando que las dos componentes,  $I_{KV}$  e  $I_{KCa}$  fueron totalmente suprimidas.

## 2. Corrientes de sodio y calcio.

Si se reemplaza el potasio por cesio en la pipeta de registro, un porcentaje importante de la corriente de salida es abolido, lo que permite una mejor visualización de la corriente de entrada de sodio ( $I_{Na}$ ), siendo incluso posible - en algunos casos- observar la corriente mantenida de calcio ( $I_{Ca}$ ). Ambas corrientes de entrada pueden ser perfectamente diferenciadas debido a su diferente curso temporal (ver sección I.B.1). Para investigar si los odorantes suprimen estas conductancias, se aplicaron pulsos de olor de  $0,5$  s de duración e intensidad creciente. Considerando el rápido desarrollo e inactivación de las corrientes de sodio (a  $-10$  mV, potencial que genera la corriente máxima, ambos procesos ocurren dentro de los primeros  $5$  ms), el tiempo necesario para la difusión de las moléculas odorantes y la latencia del efecto estudiado, fue necesario modificar el protocolo típico utilizado para las corrientes de potasio, comenzando el estímulo de olor con anterioridad ( $450$  ms) a la aplicación del pulso de potencial. Al igual que en el caso de  $I_o$ , la corriente  $I_{Na}$  activada por el primer pulso despolarizante aplicado en presencia de los odorantes indujo la supresión de esta corriente, indicando que en este caso tampoco es necesario que los canales estén abiertos para ser suprimidos.

En la Fig. 21A se muestra un ejemplo en que fue posible observar ambas corrientes de entrada activadas por una despolarización hasta  $-10$  mV. La familia de curvas corresponde a las corrientes inducidas por el pulso despolarizante en presencia de diferentes concentraciones de olores de la mezcla I. Los estímulos de olor suprimieron ambas conductancias de entrada de una manera dosis-dependiente (se incluye un control con Ringer). Para descartar una posible contribución de la inactivación de los canales de sodio a la reducción observada en  $I_{Na}$ , el intervalo de tiempo que se esperó entre la aplicación del protocolo con una determinada concentración de olor y la siguiente estimulación, fue suficientemente largo como para asegurar la remoción total de la inactivación de esta corriente ( $\sim 20$  s). El efecto de *rundown* fue también considerado: durante el período de tiempo que tomó la obtención de la familia de corrientes de la Fig.

21A, se realizaron varios registros control, los que permitieron estimar la magnitud del *rundown* y asignar un factor de corrección a cada una de las corrientes (las corrientes en la Fig. 21A han sido ya corregidas). La relación dosis-supresión de  $I_{Na}$  para el experimento en A se muestra en la parte B. La supresión de esta corriente alcanza un máximo de ~70% en esta célula particular (n = 12). En general, concentraciones de olor <sup>3</sup> 5 mM fueron capaces de inducir un efecto supresivo observable, siendo la supresión máxima de  $72 \pm 18\%$  (promedio  $\pm$  D.E.).

### **FALTA FIGURA!!!**

La Fig. 21A muestra también que existe supresión de la corriente mantenida de calcio de una manera dosis-dependiente. Sin embargo, en este caso fue difícil construir una curva de dosis-respuesta, debido a la pequeña magnitud de esta corriente y a la posible contribución de otras corrientes pequeñas (posiblemente de cesio u otros iones; Madrid y Bacigalupo, resultados no publicados; ver Delgado y Labarca, 1993). Por estas mismas razones, fue posible distinguir la presencia de la corriente de calcio en sólo 3 de las 12 células en que se realizó el experimento. Como se vio en la sección I.B.1, es posible aislar completamente la corriente de calcio mediante la adición de TEA al medio extracelular, sin embargo, en estas condiciones no fue posible mantener una célula durante el tiempo necesario para realizar repetidas estimulaciones con olor. En todo caso, el propósito de averiguar si la corriente de calcio es susceptible de ser suprimida por pulsos de olor en una forma dosis-dependiente se logró, alcanzándose una reducción de cerca del 100% de su magnitud.

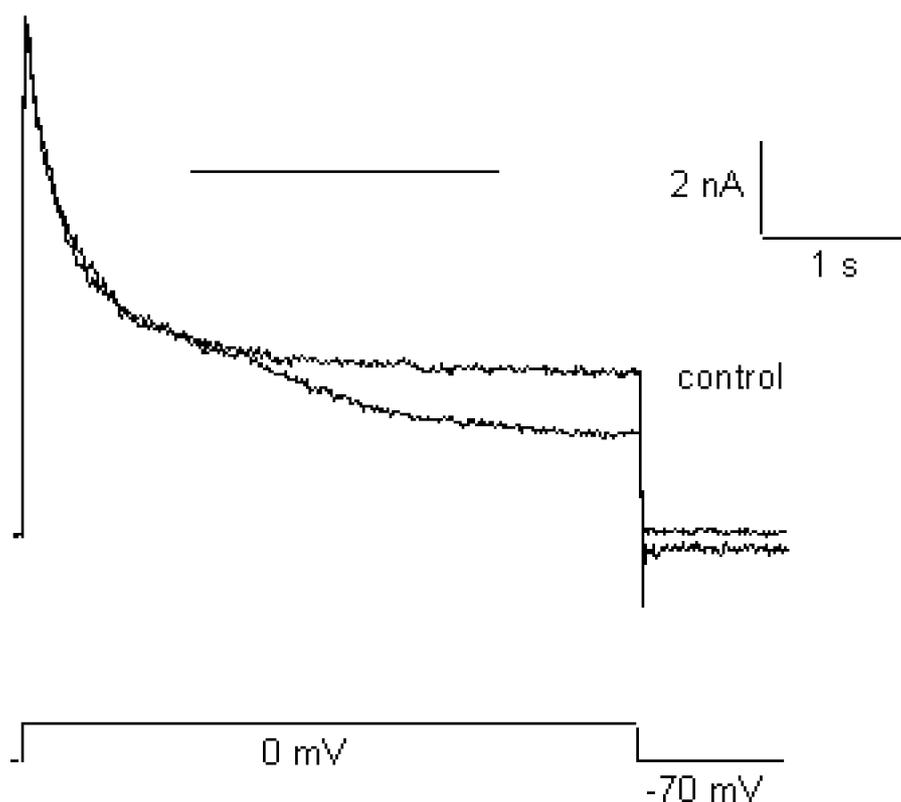
En consecuencia, en esta sección hemos mostrado que todas las conductancias dependientes del potencial presentes en *C. Caudiverbera* son suprimidas por pulsos de olor de concentración y duración similares a los usualmente utilizados para el estudio de la transducción en neuronas olfatorias aisladas.

## **D. Supresión por olor en células no olfatorias.**

---

Si la supresión es un efecto inespecífico sobre los canales dependientes del potencial de las neuronas olfatorias que es independiente de las cascadas de transducción existentes en esta célula sensorial, ésta podría afectar también a los canales iónicos presentes en células de otros tejidos. Con el objetivo de investigar esta posibilidad, aplicamos pulsos de olor (mezcla I) - de características similares a los utilizados hasta ahora - a células fotoreceptoras de *Drosophila* y examinamos su efecto sobre las corrientes dependientes del potencial. La Figura 22 muestra la supresión por odorantes de la corriente neta de salida activada al despolarizar la membrana desde -70 mV hasta 0 mV. La corriente de supresión generada corresponde a ~40% de la corriente neta de salida (corriente de potasio tipo rectificador tardío; Hardie, 1991) y presenta una cinética similar a la observada en las neuronas olfatorias del sapo y de la rata.

Este resultado sugiere que la supresión es un efecto de las moléculas de olor sobre los canales activados por el potencial, sin importar el tipo celular. Pero principalmente, éste demuestra que la supresión es independiente de la transducción olfatoria.



**Figura 22. Supresión por olor de las corrientes activadas por el potencial en fotorreceptores de *Drosophila*.** Durante una despolarización a 0 mV (bajo V-controlado,  $V_{Mant} = -70$  mV) se aplicó un estímulo de olor (barra) a una de las células fotorreceptoras de un omatidio aislado. Control: pulso de Ringer.

## E. Significado fisiológico de la supresión.

La respuesta excitatoria inducida por los odorantes en una neurona receptora consiste en la generación de un potencial de receptor despolarizante, causado por la activación de las conductancias de transducción excitatorias, acompañado de un aumento en la frecuencia de descarga de potenciales de acción. En las secciones anteriores se ha mostrado que al estimular con pulsos breves de olor a las neuronas olfatorias aisladas, la corriente de supresión se suma a las corrientes de transducción (en condiciones de V-controlado). Una pregunta importante es, entonces, si el fenómeno de supresión podría contribuir a la respuesta neuronal a olor, produciendo cambios en el potencial de membrana y afectando los patrones de descarga. Para evaluar esta posibilidad, se realizaron experimentos en condiciones de célula completa y corriente-controlada (I-controlada), estudiando el comportamiento del potencial de membrana durante la estimulación con olor. Para esto, se utilizaron neuronas incapaces de quimiotransducir los olores usados (mezcla I) de manera de averiguar si el fenómeno de supresión puede -por sí mismo- generar cambios en la frecuencia de descarga de potenciales de acción en neuronas disociadas.

La Fig. 23 muestra la descarga de una neurona olfatoria que en la situación de

V-controlado sólo respondió a la mezcla I con una corriente de supresión (ver inserto). La descarga regular de potenciales de acción exhibida por esta neurona fue inducida al despolarizarla mediante la inyección sostenida de 2 pA de corriente (en el reposo, su potencial de membrana era de  $\sim -65$  mV). En forma sucesiva, se aplicaron un pulso de solución Ringer (control) y tres pulsos de olor de concentración creciente (60 - 80  $\mu$ M). El pulso de Ringer no produjo alteraciones en la frecuencia de descarga (trazo superior); los pulsos de odorantes, en contraste, generaron despolarizaciones transitorias, incrementando la frecuencia de descarga y disminuyendo el tamaño de los potenciales de acción (trazos centrales). Durante el estímulo más intenso, los potenciales de acción cesaron repentinamente, probablemente debido a la supresión de los canales de sodio (ver Discusión). La subsecuente estimulación con olor al potencial de  $-50$  mV (ver Fig. 23), no produjo ningún efecto observable (no se incluye). Una vez reiniciada la descarga (luego de hiperpolarizar la célula hasta  $-80$  mV y despolarizarla nuevamente), la repetición del mismo protocolo arrojó resultados idénticos (no se muestra).

Un efecto similar se observó en 8 neuronas olfatorias (que sólo respondían con supresión a la mezcla I) al ser estimuladas mientras presentaban una descarga regular de potenciales de acción. En estas neuronas, la descarga tónica se produjo ya sea en forma espontánea, luego de hiperpolarizarlas mediante inyección de corriente durante unos segundos y posteriormente volver a la condición de corriente cero (*off-spikes*), o al despolarizarlas respecto de su condición de reposo. La concentración de olor necesaria para inducir el cese de la descarga varió entre 40 y 130  $\mu$ M, con un promedio de 70  $\mu$ M.

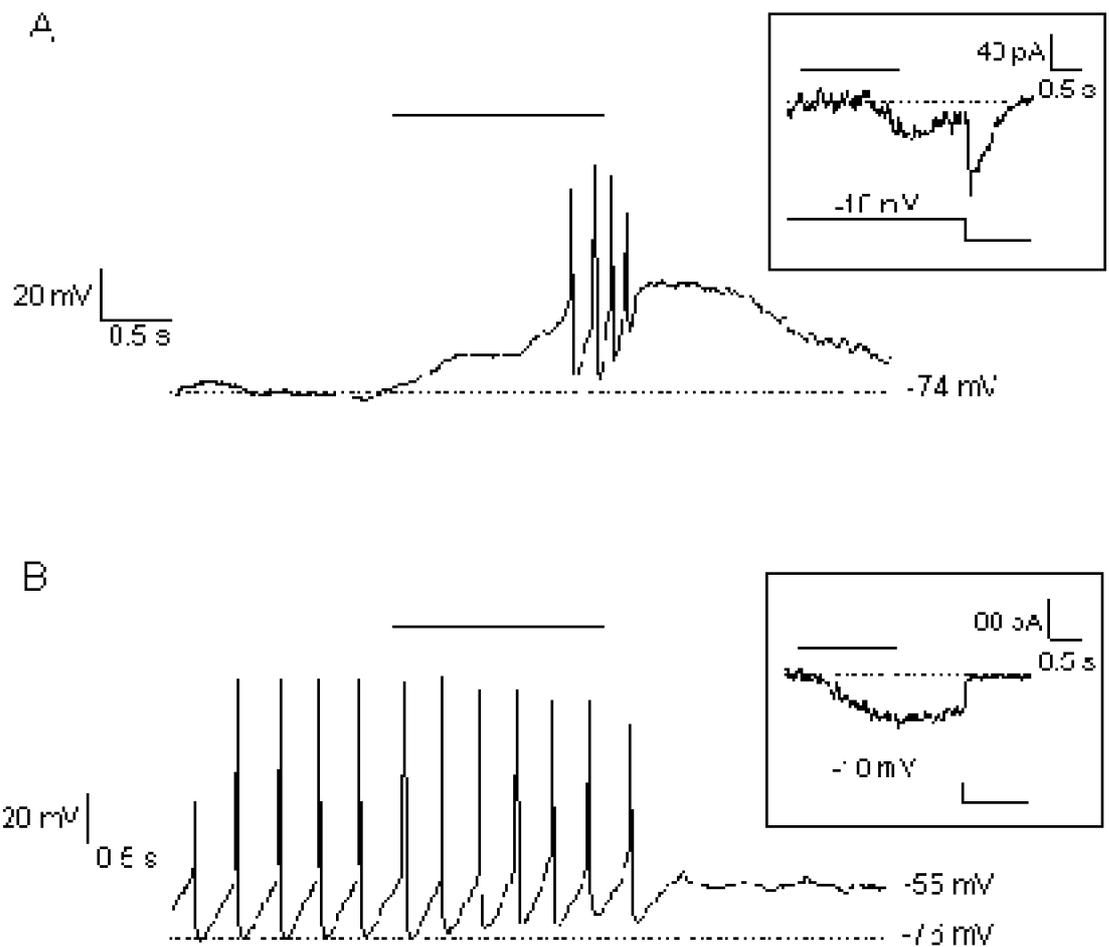
En la Fig. 24 se presenta otro ejemplo que ilustra el efecto de la supresión sobre la descarga neuronal y que permite su comparación con la activación de la cascada de transducción excitatoria en la misma célula. Esto fue posible debido a que se trata de una neurona que al comienzo del experimento respondió a la mezcla I con la activación de la corriente de transducción despolarizante, pero que luego de algunos minutos perdió definitivamente esta capacidad, conservando sólo la corriente de supresión (probablemente debido al *rundown* de los componentes de la cascada de transducción; ver sección III.B.4). Las respuestas a olor exhibidas por la célula en condiciones de I-controlada durante ambas etapas se grafican en la Fig. 24. Los insertos de las partes A y B de esta figura presentan la corriente neta inducida por el olor en la situación de V-controlado, al comienzo y al final del experimento, respectivamente. La pérdida de la corriente de transducción excitatoria puede deducirse de la desaparición de la corriente de cola. En I-controlada, la neurona se encontraba originalmente a un potencial de reposo de  $\sim -74$  mV, descargando esporádicamente un par de potenciales de acción en forma espontánea (misma neurona de la Fig. 7B). La activación de la transducción por el pulso de olor (50  $\mu$ M) indujo una pronunciada despolarización (hasta  $\sim -30$  mV), gatillando la descarga de 3 - 4 espigas. Un ejemplo de esta típica respuesta excitatoria se muestra en la Fig. 24A. Durante la etapa final del experimento, sin embargo, la estimulación con un pulso de 130  $\mu$ M de olor no indujo cambios apreciables del potencial en la situación de reposo (no se incluye), pero al inducir la descarga mediante inyección de corriente y estimular en esas condiciones, se observó un comportamiento similar al ilustrado en la Fig. 23: una leve despolarización acompañada de un pequeño aumento en la frecuencia de descarga, hasta llegar al punto en que la descarga cesa totalmente, situación que

---

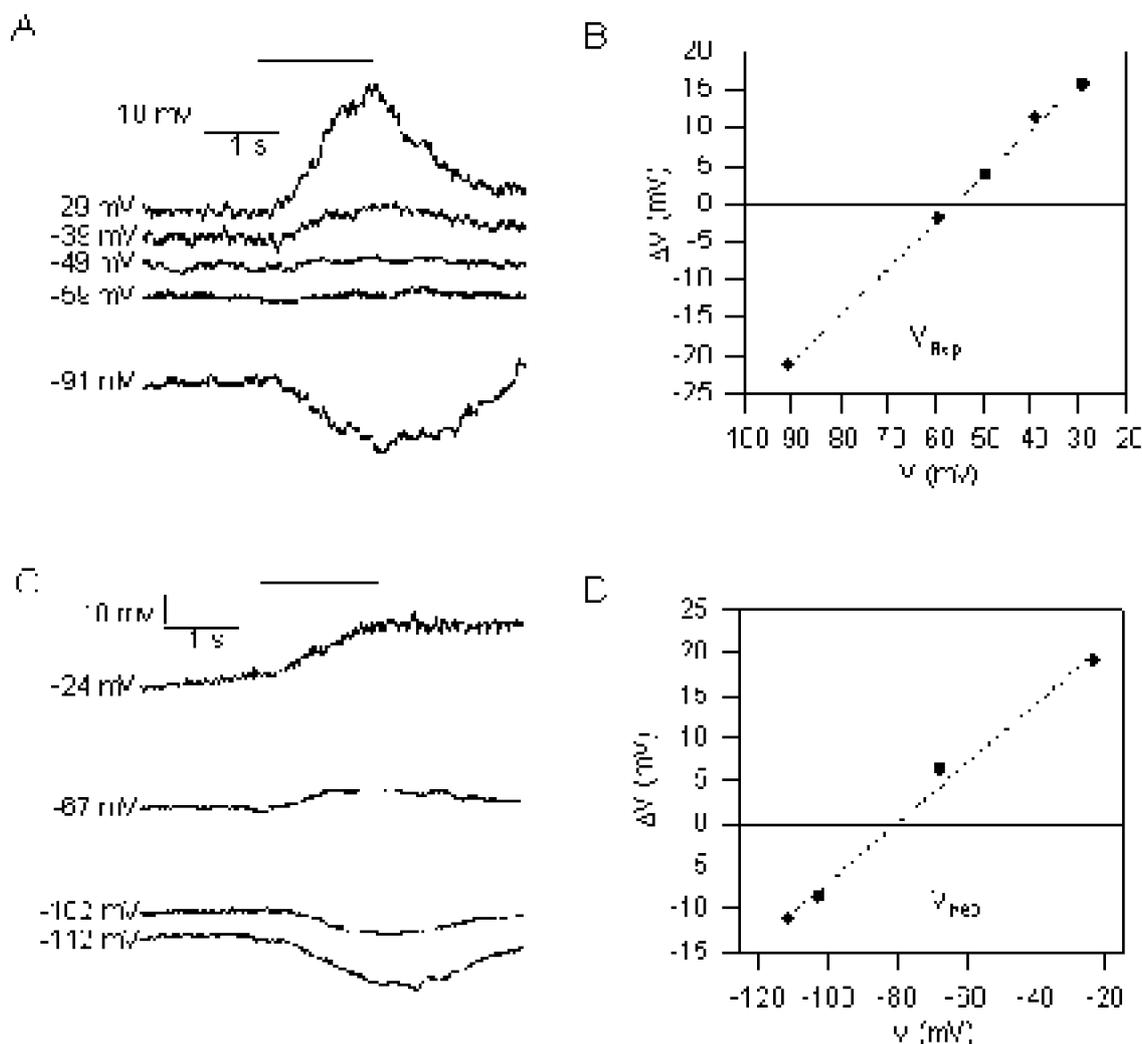
muestra el registro de la Fig. 24B.

### **FALTA!!!!**

En neuronas que no presentaban actividad espontánea, el efecto de la supresión al potencial de reposo podía ser nulo, levemente despolarizante o levemente hiperpolarizante, por lo que se realizó un análisis sistemático de la polaridad y magnitud de este *potencial de receptor* en función del potencial de membrana. Para esto, neuronas silentes mantenidas en condiciones de I-controlada y cuyo potencial de membrana era modificado mediante inyección de corriente, fueron estimuladas a diferentes potenciales con pulsos idénticos de la mezcla I. Los resultados fueron despolarizaciones o hiperpolarizaciones, dependiendo del potencial de membrana existente en el momento de la aplicación del estímulo. El valor del potencial al que este efecto del olor cambiaba de signo, varió de una célula a otra y fue usualmente diferente del potencial de reposo de la neurona. En la Fig. 25 se muestran dos ejemplos correspondientes a diferentes neuronas. En la primera neurona (Fig. 25A) la aplicación del estímulo de olor al potencial de reposo ( $\sim -60$  mV), indujo una hiperpolarización muy leve (de unos 2 mV, aproximadamente). Para un potencial de membrana más negativo ( $\sim -90$  mV) se generó una pronunciada hiperpolarización (de unos 20 mV); mientras que para potenciales mayores que  $-50$  mV se produjeron despolarizaciones cada vez más apreciables. La Fig. 25B grafica esta variación en el potencial de membrana (DV) en función del valor del mismo (V) en el momento de aplicar los odorantes. Los datos se ajustan bien a una recta que cambia de signo a un potencial de  $-55$  mV, valor relativamente cercano al potencial de reposo. En las Figuras 24 C y D (correspondientes a la misma neurona de la Fig. 23) se muestran los registros obtenidos al aplicar los olores a diferentes potenciales de membrana y el gráfico de DV *versus* V, respectivamente. En este caso, la estimulación al potencial de reposo ( $\sim -65$  mV) indujo una clara despolarización y el gráfico en C predice una inversión del efecto cercana a  $-80$  mV.



**Figura 24. Comparación entre los efectos de transducción y supresión en la misma neurona. A.** Respuesta de una célula (*I*-controlada,  $I = 0$ ) estimulada con un pulso de la mezcla I ( $50 \mu\text{M}$ ), mientras se encontraba silente. Inserto: registro obtenido previamente en condiciones de *V*-controlado, utilizando un estímulo idéntico. Nótese la corriente de cola al retornar a  $-70 \text{ mV}$ . **B.** En una etapa posterior del experimento, la célula descargó regularmente luego de ser despolarizada mediante la inyección de  $2 \text{ pA}$ . Un pulso de olor ( $130 \mu\text{M}$ ) indujo el cese de la descarga. La repetición del estímulo (a  $V = -50 \text{ mV}$ ) no produjo un efecto evidente (no se incluye). Inserto: En *V*-controlado, la estimulación con un pulso similar sólo indujo supresión.



**Figura 25. Efecto de la supresión en función del potencial de membrana. A.**

Respuestas a cuatro potenciales de membrana diferentes (indicados junto a cada registro), en condiciones de corriente controlada (el potencial de membrana de la célula fue modificado mediante inyección de corriente). **B.** Cambios de voltaje inducidos por el olor (máximos) en función del potencial de membrana (medido antes de la aplicación del estímulo), para la célula en A. **C.** Otro ejemplo, (la misma célula que en 23A). **D.** Relación  $\Delta V$  vs.  $V$ , para la célula en C.

Los resultados indican que los olores pueden afectar la descarga de potenciales de acción de las neuronas disociadas no solamente a través de la activación de cascadas de transducción, sino también suprimiendo a las conductancias dependientes del potencial que participan en la generación y mantención de la descarga neuronal. La posibilidad de que la supresión tenga una participación en la modulación de la descarga de las neuronas olfatorias *in situ*, así como las características y posibles implicancias de esta función, serán discutidas en el siguiente capítulo.



---

## DISCUSIÓN

La transducción olfativa es un proceso que depende de la acción de segundos mensajeros intracelulares y cuya latencia es de cientos de milisegundos. La vía de transducción que ha sido mejor caracterizada en vertebrados tiene por mensajero secundario al AMPc y su resultado es un aumento en la descarga de potenciales de acción. En *C. caudiverbera* y en la rata, la estimulación de las neuronas olfatorias con una mezcla de odorantes florales y frutales (mezcla I) induce mayoritariamente este tipo de respuestas (Sanhueza y cols., 2000).

Durante el desarrollo de esta Tesis se observó que al utilizar pipetas de estímulo que permitían la llegada de los odorantes a toda la célula, las corrientes inducidas por la mezcla I variaban ampliamente de una neurona a otra, tanto en el curso temporal como en la dependencia del potencial. Con frecuencia estas respuestas se alejaban claramente de las que resultan de la activación de la vía del AMPc y tampoco se parecían a las respuestas de tipo inhibitorio, causadas por una corriente de potasio inducida por olor (Morales y cols., 1994). Estas observaciones motivaron un estudio detallado y comparativo de las respuestas a la mezcla I registradas en las configuraciones de voltaje y corriente controlados, en distintas células y para diferentes localizaciones del estímulo de olor. Este estudio permitió descubrir la existencia de un efecto de los odorantes que es diferente de la transducción y cuya participación en la respuesta a olor no había sido reportada hasta ahora. En esta Tesis se han estudiado con cierto detalle las características de este fenómeno, determinándose que se trataría de una supresión de las conductancias dependientes del potencial ubicadas en el cuerpo celular. Los resultados indican que el mecanismo que subyace a esta supresión es independiente de

la transducción y que se trata de un efecto directo e inespecífico de los odorantes sobre los canales somáticos. La eventual activación de la cascada de transducción junto al efecto de supresión - cuya magnitud depende de factores que se discutirán más adelante - explica la variedad de respuestas observadas en neuronas olfatorias aisladas. Se desarrolló un método de corrección que permite aislar ambas componentes de la respuesta a olor. Por último, se ha investigado la posible participación del efecto de supresión en la respuesta fisiológica a los odorantes, observando su efecto sobre la descarga neuronal.

## **Caracterización de la supresión por olor.**

Se denominó *corriente de supresión* ( $I_S$ ) a la corriente inducida por olor ( $I_{OD}$ ) en aquellas neuronas que no transducían los odorantes aplicados. En estas neuronas, se estudiaron las propiedades de la corriente  $I_S$ , determinándose que ésta comienza a ser detectable a partir del mismo valor del potencial que la corriente activada por despolarización ( $I_O$ ) y que su signo es siempre negativo, contrariamente a  $I_O$ . La magnitud de  $I_S$  crece linealmente con el potencial en el rango estudiado, similarmente a lo que ocurre con la magnitud de  $I_O$  en ese mismo rango;  $I_S$ , sin embargo, no supera nunca en magnitud a  $I_O$ . La curva I-V de  $I_S$  difiere de las asociadas a las distintas conductancias presentes en estas células, y además, dadas las condiciones iónicas de nuestros experimentos (condiciones fisiológicas), ésta no puede ser explicada por la apertura de canales iónicos. Por último, el efecto no parece involucrar al transportador de  $Na^+ - Ca^{2+}$ , a juzgar por los experimentos con litio.

Estas propiedades de la corriente  $I_S$ , junto al hecho de que la exposición crónica a los odorantes produce una supresión inespecífica y reversible de la activación de corrientes voltaje-dependientes en neuronas olfatorias disociadas (Kawai y cols., 1997), indican que el efecto del olor que estamos estudiando se debe, efectivamente, al cierre de conductancias dependientes del potencial. La posibilidad de que esta supresión pueda ser producida por pulsos de olor de características similares a los utilizados para inducir la quimiotransducción, no había sido reportada hasta ahora y sugiere su participación en la generación de la respuesta a olor, al menos en neuronas olfatorias aisladas.

En primera instancia, se ha estudiado la supresión de la corriente neta de salida  $I_O$ , por tratarse de una corriente grande y sostenida y por lo tanto fácil de abordar. Se ha visto que  $I_S$  está presente en casi todas las neuronas olfatorias estudiadas, en forma aislada o acompañada por una corriente de transducción. Para caracterizar la supresión, sin embargo, se usaron neuronas que no transducían los olores utilizados.

Las concentraciones de olor que inducen supresión son similares a las que activan la transducción en neuronas olfatorias aisladas (Firestein y cols, 1990, Morales y cols, 1994), como lo indican las curvas concentración-respuesta (Figs. 14 y 21). Sin embargo, en el caso de la corriente  $I_O$  la concentración necesaria para producir un efecto observable varió ampliamente de una célula a otra; lo mismo ocurrió con la magnitud

máxima de la supresión en cada célula (ver Fig. 14). Considerando que la contribución relativa a la corriente  $I_o$  de los dos tipos de conductancias de potasio activadas por el potencial cambia de una célula a otra, estas variaciones en la magnitud de la supresión podrían deberse a una diferencia en la sensibilidad de estos canales al olor (lo que ha sido observado en la situación crónica; Kawai y cols, 1997). Por otro lado, la magnitud del efecto dependía también de una serie de factores geométricos relacionados con la forma en que los olores eran aplicados a las neuronas. La pipeta de estimulación era ubicada a un costado de cada célula y es probable que la concentración de odorantes no fuese homogénea a lo largo de toda la superficie. Estas diferencias en la concentración dependían del tamaño y la forma de las neuronas - incluyendo el largo de la dendrita, que es altamente variable-, de diferencias en la posición de la pipeta respecto de la célula, y de pequeñas diferencias en la forma de la pipeta.

La curva I-V de la corriente de supresión pudo ajustarse a una recta en todos los casos, en el rango de potencial estudiado, aunque la pendiente de ésta varió de una célula a otra. Esto último se debió a diferencias en la magnitud de  $I_S$ , la que dependía de la concentración de odorantes utilizada y de las importantes variaciones en el tamaño de la corriente  $I_o$ , además de los factores señalados en el párrafo anterior. Sin embargo, las condiciones experimentales permanecieron constantes en cada caso, permitiéndonos obtener importante información respecto de la dependencia de voltaje y cinética de la supresión.

En los casos en que los odorantes de la mezcla I activaban la vía de transducción excitatoria además de inducir supresión, ambas corrientes se sobreponían, generando respuestas complejas y variadas. El grado de distorsión de la curva I-V de la corriente neta activada por olor depende de las magnitudes relativas de las componentes  $I_S$  e  $I_T$ , siendo más pronunciado mientras más cercanos sean estos valores. La respuesta neta fue corregida restando el efecto de la supresión y la curva I-V corregida resultó igual a las reportadas en varias especies cuando los estímulos de olor han sido restringidos a la membrana ciliar (Kurahashi, 1989; Firestein y cols, 1990; Firestein y Werblin, 1989; ver Morales y Bacigalupo, 1996; Schild y Restrepo, 1998). En aquellas células en que las diferencias en el curso temporal de ambos efectos del olor no fueron suficientemente grandes como para permitir la distinción clara de ambas componentes, pudimos corregir las corrientes inducidas por olor sólo por el método general (método II). Este método se basa en la linealidad de la dependencia de voltaje de  $I_S$ , y en el hecho de que  $I_T$  se anula a 0 mV. La validez de este método fue avalada por aquellos casos en que  $I_S$  e  $I_T$  estaban claramente separados en el tiempo, permitiendo la estimación de  $I_S$  a partir de los mismos registros (método I). En estos casos, ambos métodos dieron resultados virtualmente idénticos. Las pequeñas diferencias entre las curvas corregidas observadas en algunos casos, son atribuibles al decaimiento de las corrientes dependientes del potencial. Además, fue posible descomponer la corriente neta inducida por olor, obteniendo aisladamente las corrientes  $I_S$  e  $I_T$  en función del tiempo (Fig. 16).

En conclusión, independientemente del grado de distorsión presentado por la respuesta a olor, ésta pudo ser corregida mediante los métodos propuestos. En todo caso, para disminuir la interferencia de la supresión al estudiar la transducción a aquellos potenciales en que los canales voltaje-dependientes se encuentran abiertos, es

importante enfocar el estímulo sobre la zona de los cilios olfatorios.

## **El mecanismo de la supresión.**

Los resultados indican que la supresión por olor es un efecto inespecífico sobre los canales iónicos activados por el potencial, presente en prácticamente todas las neuronas olfatorias estudiadas, incluso aquellas que han perdido sus cilios durante el proceso de disociación. En contraste, la transducción es un fenómeno fisiológico específico: al estimular con un olor particular, se inducen corrientes de transducción en una pequeña fracción de las neuronas olfatorias y nunca en células carentes de cilios. Esto sugiere que el mecanismo responsable de la supresión es independiente de la transducción. Mayor evidencia en este sentido fue aportada por los experimentos de estimulación localizada. En ellos se observó que  $I_S$  era mayor y más rápida cuando los pulsos de olor eran dirigidos hacia el cuerpo celular –donde se ubican los canales dependientes del potencial– que cuando éstos eran aplicados sobre los cilios –donde se localiza el proceso de transducción. Por el contrario, la magnitud de la corriente de transducción era mayor al estimular los cilios, como lo indica el análisis de las corrientes de cola.

La latencia de la corriente de supresión fue bastante variable, debido principalmente a diferencias en la intensidad del estímulo (presión del pulso de olor y distancia a la que éste era aplicado) y a los problemas geométricos que ya se mencionaron. De estos factores no sólo depende la concentración final de odorantes en cada punto de la superficie celular, sino también la rapidez con que se alcanza el nivel requerido para generar una respuesta eléctrica observable (latencia). Los registros de calibración (Fig. 2) ilustran este hecho, puesto que la latencia de la corriente de entrada de potasio depende claramente de la presión con que se aplica el estímulo. En todo caso, las latencias mínimas observadas fueron al menos un orden de magnitud menores que la de la transducción, siendo comparables a la latencia de la corriente de entrada inducida por un pulso de solución alta en potasio, aplicado desde la misma distancia y con la misma presión. Este resultado indica que, contrariamente a la transducción, los olores causarían la supresión actuando **directamente** sobre los canales involucrados, sin la participación de segundos mensajeros. Por otro lado, el hecho de que  $I_S$  sea considerablemente menos afectada por el decaimiento celular que  $I_T$ , constituye una evidencia adicional en favor de que la supresión se debería a una acción directa de los odorantes sobre los canales somáticos, en contraste con la transducción que es mediada por una cascada intracelular.

Otra serie de experimentos aportó más antecedentes respecto de la falta de selectividad del fenómeno de supresión, tanto en lo que se refiere al blanco del efecto, como a la variedad de odorantes capaces de inducirlo. Los resultados indican que todas las conductancias activadas por el potencial presentes en *C. caudiverbera* son suprimidas por pulsos de olor. Además, el efecto de supresión fue inducido tanto por odorantes florales y frutales (mezcla I) como por odorantes pútridos (mezcla II) en neuronas olfatorias del sapo y la rata. Más aún, la estimulación con pulsos de olor de

características similares a los utilizados en los receptores olfatorios de estas dos especies, indujo una reducción de las corrientes activadas por el potencial en células fotorreceptoras de *Drosophila*. Estos resultados indican que la supresión es un fenómeno altamente inespecífico, que puede afectar a diferentes canales activados por el potencial, con independencia del tipo celular. La supresión es inespecífica también en el sentido de que puede ser inducida por odorantes de naturaleza muy diferente. Además, los experimentos en *Drosophila* muestran claramente que la supresión es independiente de la quimiotransducción olfativa.

La falta de selectividad en relación al blanco de la supresión sugiere que el mecanismo involucrado es similar al que genera la supresión de los canales de transducción (Kurahashi y cols., 1994) y cuya naturaleza se desconoce. En el presente trabajo, la diferencia entre la latencia de la corriente inducida por un pulso de solución alta en potasio y la latencia del efecto de supresión fue de unos 20 ms, lo que coincide con el tiempo que demora el efecto descrito por Kurahashi y cols. (1994). La supresión podría entonces ser un efecto directo de las moléculas de olor sobre canales iónicos de muy variadas características.

La naturaleza liposoluble de muchos odorantes permite su partición en la membrana celular, lo que hace posible que éstos supriman la conducción de corriente a través de los canales iónicos de una manera similar a la llamada *vía hidrofóbica de bloqueo* de los canales de sodio por los anestésicos locales (ALs; Hille, 1977b). Según este modelo, los ALs lipofílicos producirían su acción bloqueadora al acceder a su receptor en el canal iónico a través de la membrana lipídica. Esta similitud entre la supresión por olores y la acción de los ALs fue inicialmente propuesta por Kawai y cols. (1997) al estudiar los efectos de la administración prolongada de odorantes en el baño. Varias evidencias presentadas en esta Tesis y los resultados obtenidos durante el último año por Kawai en la situación crónica (1999a,b), permiten relacionar la supresión por olores con este efecto inespecífico de los ALs: 1) el rango de concentraciones en que los ALs (aminas terciarias: lidocaína, procaína, benzocaína, etc.) son efectivas ( $IC_{50} = 0.1 - 1$  mM; Hille, 1977a) coincide con las concentraciones de olor capaces de generar una supresión considerable; 2) para producir supresión no es necesaria la interacción de las moléculas de olor con los canales abiertos (ver secciones III.A.1 y III.C.2), similarmente a lo que ocurre con algunos ALs liposolubles (Hille, 1977a,b); 3) al igual que los ALs (Hille, 1977b; Butterworth y Strichartz, 1990; Rossner y Freese, 1997), los odorantes inducen un desplazamiento de las curvas de inactivación en estado estacionario de los canales de sodio y calcio, hacia valores más negativos del potencial, pero no producen alteraciones en las curvas de activación (Kawai, 1999b).

El último punto del párrafo anterior, sin embargo, podría no ser cierto para las corrientes de potasio: si bien se ha descrito un bloqueo de estas corrientes por ALs (Andreasen y Hablitz, 1993), este efecto no parece estar asociado a un desplazamiento evidente de las curvas de activación ni de inactivación en estado estacionario. Resulta interesante, por lo tanto, que la supresión por odorantes de la corriente de potasio tipo rectificador tardío tampoco traiga consigo alteraciones en la dependencia del potencial de la activación o inactivación de estos canales (Kawai, 1999a).

Los resultados de la sección III.A.1 sugieren que el mecanismo mediante el cual las

moléculas de olor inducen la supresión de las corrientes de salida es independiente del potencial de membrana y que la variación lineal de  $I_S$  con el potencial se debe solamente a la dependencia - también lineal- de la corriente  $I_O$  respecto del voltaje, en el rango estudiado. Esta independencia del potencial y el hecho de que odorantes de naturaleza tan diferente puedan ser capaces de producir supresión, resultan consistentes con un mecanismo similar a la vía hidrofóbica de los ALs. Más aún, podría comprenderse la diferencia en la magnitud de la supresión producida por las mezclas I y II: la solubilidad lipídica de los componentes de la primera mezcla es mayor que la que poseen los elementos de la segunda, permitiendo que su partición en la membrana celular sea más eficaz.

## **Significado fisiológico de la supresión.**

El proceso de transducción olfativa culmina con la apertura de las conductancias de transducción y la generación un potencial de receptor despolarizante o hiperpolarizante, con el consecuente cambio en la frecuencia de descarga de potenciales de acción. Es en este momento que la acción de los olores comienza a tener una importancia fisiológica, por constituir el primer paso en el proceso de codificación que conduce a la percepción olfativa. Las conductancias activadas por el potencial juegan un papel relevante tanto en la generación de la descarga espontánea, como en las características particulares de la respuesta a olor de una neurona olfatoria. Tiene sentido, entonces, preguntarse si la supresión de estas conductancias puede producir cambios en el potencial de membrana y modificaciones en la descarga neuronal. Para abordar este problema, se investigó si la estimulación con pulsos de olor (mezcla I) generaba cambios en el potencial de membrana de neuronas olfatorias mantenidas en condiciones de corriente controlada; para esto se seleccionaron células que no respondían a los olores utilizados con una corriente de transducción, sino que sólo presentaban supresión.

Los resultados de la sección III.E indican que la supresión puede efectivamente producir alteraciones en el potencial de membrana y en la frecuencia de descarga de potenciales de acción. Ahora bien, puesto que la supresión por olores afecta a todas las conductancias dependientes del potencial, sean éstas despolarizantes o hiperpolarizantes, sus consecuencias sobre el potencial de membrana serán el resultado de la superposición de los efectos sobre las diferentes conductancias. Sin embargo, aunque la acción de las moléculas de olor sobre los canales iónicos no requiere que éstos estén abiertos, el efecto producido por la supresión depende, en la práctica, de las conductancias que se encuentran activas en el momento de aplicar el estímulo de olor. En particular, si la célula presenta una descarga basal espontánea, el efecto de los odorantes sobre los canales que participan en la generación del potencial de acción será relevante y la supresión actuará como un modulador de la descarga. Los registros de las Figs. 23 y 24B constituyen ejemplos representativos del efecto producido por la supresión en células que descargaban potenciales de acción en forma regular y que no transducían los olores aplicados ( $n = 8$ ). En todos estos casos, por sobre un cierto umbral de

---

concentración (que varió de una célula a otra entre 40  $\mu\text{M}$  y 130  $\mu\text{M}$ ), la despolarización culminó con la interrupción de los potenciales de acción. Puesto que una subsecuente estimulación con olor (al potencial que quedaba la célula, sea este el potencial de reposo o un valor más despolarizado o hiperpolarizado respecto del reposo gracias a la inyección de corriente) muchas veces no provocó ningún efecto observable, deducimos que la modulación de la descarga se debe principalmente a la supresión de los canales involucrados en la generación y mantención de los potenciales de acción. En efecto, la despolarización inicial puede deberse a la supresión de las conductancias de potasio implicadas en la repolarización de la membrana después de cada disparo. La interrupción de la descarga, por otro lado, es posiblemente consecuencia de la supresión de los canales de sodio o de que la despolarización inicial haya alcanzado el umbral de inactivación de estos canales. Puesto que últimamente se ha asociado la supresión de los canales de sodio (bajo estimulación prolongada con olores) con un desplazamiento de su curva de inactivación hacia potenciales más negativos (Kawai, 1999), resulta difícil separar ambas alternativas.

Al encontrarse silente, una neurona puede responder con una despolarización o hiperpolarización, según cual sea el potencial de membrana en el momento de la estimulación. En la situación de reposo (corriente cero) la supresión puede causar variaciones en el potencial de unos pocos milivoltios y los gráficos  $\Delta V$  versus  $V$  indican que el potencial al que se invierte la polaridad del efecto no corresponde, en general, al potencial de reposo de la neurona. Esto sugiere que aquellas conductancias que participan en la fijación del potencial de reposo (Restrepo y Schild, 1998) son también suprimidas por los odorantes, aunque probablemente presenten diferentes sensibilidades a éstos.

El leve efecto de la supresión en la condición de reposo y el hecho de que nunca se haya observado la inducción de potenciales de acción a partir de esta condición en neuronas que solo exhibían supresión, sugieren que la acción de los odorantes sobre la actividad neuronal sería relevante principalmente en células que se encuentran disparando, ya sea espontáneamente o como resultado de la activación de la cascada excitatoria. Así, la supresión podría participar en la modulación del efecto excitatorio de los odorantes, amplificándolo en cierto rango de concentraciones, pero inhibiendo la descarga por sobre un determinado valor umbral de la concentración.

Considerando la evidencia presentada en esta Tesis, la supresión de las corrientes dependientes del potencial constituye un factor importante en la caracterización de la respuesta a olor, al menos en neuronas olfatorias aisladas, que es donde se ha realizado y continúa realizándose la mayor parte de los experimentos destinados a estudiar la transducción.

En el epitelio olfatorio, sólo los cilios y parte del botón dendrítico de estas neuronas se encuentran directamente expuestos a los odorantes; la presencia de uniones estrechas entre las células epiteliales constituye una barrera de difusión hacia las membranas basolaterales. Sin embargo, dada la naturaleza hidrofóbica de muchos odorantes, es posible que efectivamente una parte de ellos alcance el soma neuronal. De hecho, evidencia en favor de una rápida difusión de las moléculas odorantes a través del epitelio olfatorio ha sido reportada por Lowe y Gold (1991). Utilizando una pipeta de

succión que permitía separar las soluciones externas a las que estaban expuestos el soma y los cilios de una neurona aislada, estos investigadores mostraron que los odorantes aplicados en la región somática (ubicada al exterior de la pipeta de succión) son capaces de difundir a través de la membrana celular y generar una corriente de transducción al alcanzar los cilios (en el interior de la pipeta).

Con la información disponible hasta ahora resulta difícil evaluar la posibilidad de que las moléculas odorantes alcancen la membrana basolateral de las neuronas olfatorias en una concentración suficiente como para inducir una supresión fisiológicamente relevante, pues no se sabe realmente cuál es la concentración efectiva de odorantes en contacto con la membrana apical *in situ*. Si bien los vertebrados son capaces de detectar olores que en el aire se encuentran típicamente en el rango nano a micromolar, en estudios electrofisiológicos en que los odorantes son aplicados disueltos en la solución pseudo-extracelular es necesario utilizar concentraciones en el rango micro a milimolar para inducir respuestas a olor en neuronas disociadas. Es posible que estas altas concentraciones reflejen un deterioro en la maquinaria de transducción debido a la pérdida del entorno fisiológico de las neuronas olfatorias o como consecuencia del proceso de disociación. Por otro lado, en el animal vivo las neuronas del epitelio olfatorio se encuentran rodeadas por una mucosa rica en proteínas a las que se unen las moléculas odorantes (OBPs, *odorant-binding proteins*; para una revisión ver Pelosi, 1994) cuya función se piensa estaría relacionada con el transporte y acumulación local (y en algunos casos, la remoción) de los odorantes en la mucosa que rodea los cilios olfatorios (Steinbrecht, 1998; Pelosi, 1996).

Los resultados de esta Tesis sugieren que en caso de ser efectiva *in vivo*, la supresión no-selectiva podría jugar un papel en la codificación de la intensidad de los estímulos de olor (Gomez, 2000), o como mecanismo de regulación negativa por sobre cierto nivel de concentración.

En todo caso, para estudiar en qué medida el fenómeno de supresión participa en la generación de la respuesta a olor *in vivo*, es necesario diseñar experimentos apropiados *in situ*, lo que va más allá de los objetivos de esta Tesis.

---

## REFERENCIAS

1. Andreasen, M. y Hablitz, J.J. 1993. Local anesthetics block transient outward potassium currents in rat neocortical neurons. *J. Neurophysiol.* **69**:1966-1975.
2. Bacigalupo, J., Bautista, D.M., Brinck, D.L, Hetzer, J.F. y O'Day, P.M. Cyclic-GMP enhances light-induced excitation and induces membrane currents in *Drosophila* retinal photoreceptors. *J. Neurosci.* **15**:7196-7200, 1995.
3. Boekhoff, I., Tareilus, E., Strotmann, J. y Breer, H. 1990. Rapid activation of alternative second messenger pathways by different odorants. *EMBO J.* **9**:2453-2458.
4. Buck, L.B. 1996. Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**:517-544.
5. Buck, L. y Axel, R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odorant recognition. *Cell* **65**:175-187.
6. Butterworth, J.F. y Strichartz, G.R. 1990. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology* **72**:711-734.
7. Chen, T.-W 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.
8. 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** (*Cell Physiol.* 33):C1418-C1427.
9. Dionne, V.E. 1992. Chemosensory responses in isolated receptor neurons from

- Necturus maculosus*. *J. Gen. Physiol.* **99**:415-433.
10. Duchamp, A., Reval, M.F., Holley, A. y MacLeod, P. 1974. Odor discrimination by frog olfactory receptors. *Chem. Senses Flavour.* **1**:213-233.
  11. Duchamp-Viret, P. Duchamp, A. y Chaput, M.A. 2000. Peripheral odor coding in the rat and frog: quality and intensity specification. *J. Neurosci.* **20**(6):2383-2390.
  12. Firestein, S. y Shepherd, G.M. 1995. Interaction of anionic and cationic currents leads to a voltage dependence in the odor response of olfactory receptor neurons. *J. Neurophysiol.* **73**:562-567.
  13. Firestein, S., Shepherd, G.M. y Werblin, F.S. 1990. Time course of the of the membrane current underlying sensory transduction in salamander olfactory receptor neurons. *J. Physiol. (Lond)* **430**: 135-158.
  14. Firestein, S. y Werblin, F. 1989. Odor induced membrane currents in vertebrate olfactory receptor neurons. *Science* **244**:79-82.
  15. Frings, S. y Lindemann, B. 1990. Single unit recordings from olfactory cilia. *Biophys. J.* **57**: 1091-1094.
  16. Gomez, G. (2000). *Olfactory receptor neurons are complex odorant information processors*. Focus on "Excitation, inhibition and suppression by odors in isolated toad and rat olfactory receptor neurons". *Am. J. Physiol. 279 (Cell Physiol.)*: C19-C20.
  17. Graziadei, P.P.C y Graziadei, G.A.M. 1979. Neurogenesis and neuron regeneration in olfaction system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J. Neurocytology.* **8**:1-18.
  18. Hamill, O.P., Marty, E., Sakmann, B. y 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.
  19. Hardie, R.C. 1991. Voltage-sensitive potassium channels in *Drosophila* photoreceptors. *J. Neurosci.* **11**: 3079-3095.
  20. Hille, B. 1977a. The pH-dependent rate of action of local anesthetics on the node of Ranvier. *J. Gen. Physiol.* **69**:475-496.
  21. Hille, B. 1977b. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J. Gen. Physiol.* **69**:497-515.
  22. Hille, B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. Sinauer; Sunderland, MA.
  23. 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.
  24. Jones, D.T. y Reed, R.R. 1989. G<sub>olf</sub>: an olfactory neuron specific G protein involved in odorant signal transduction. *Science* **244**:790-795.
  25. Kandel, E.R., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. 2000. Principles of neural science. pp 625-645. McGraw-Hill.
  26. 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.
  27. Kawai, F., Kurahashi, T. y Kaneko, A. 1997. Nonselective suppression of voltage-gated currents by odorants in the newt olfactory receptor cells. *J. Gen. Physiol.* **109**:265-272.

- 
28. Kawai, F. 1999a. Odorant suppression of delayed rectifier potassium current in newt olfactory receptor cells. *Neurosci. Lett.* **269**:45-48.
  29. Kawai, F. 1999b. Odorants suppress T- and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in olfactory receptor cells by shifting their inactivation curve to more negative voltage. *Neurosci. Res.* **35**:253-263.
  30. Kleene, S.J. 1993. Origin of the chloride current in olfactory transduction. *Neuron* **11**:123-132.
  31. Kleene, S.J. y Gesteland, R.C. 1991. Transmembrane currents in frog olfactory cilia. *J. Membrane Biol.* **120**:75-81.
  32. 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.
  33. Kurahashi, T. y Shibuya, T. 1990.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent adaptive properties in the solitary olfactory receptor cell of the newt. *Brain Res.* **515**:261-268.
  34. Kurahashi, T., Lowe, G. y Gold, G.H. 1994. Suppression of odorant responses by odorants in olfactory receptor neurons. *Science* **265**:118-120.
  35. Kurahashi, T. y Yau, K.-W. 1993. Co-existence of cationic and chloride components of odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor neurons. *Nature* **363**:71-74.
  36. Lischka, F.W. y Schild, D. 1993. Standing calcium gradients in olfactory receptor neurons can be abolished by amiloride or Ruthenium Red. *J. Gen. Physiol.* **102**:817-831.
  37. Lischka, F.W., Teeter, J.H. y Restrepo, D. 1999. Odorants suppress a voltage-activated  $\text{K}^{+}$  conductance in rat olfactory neurons. *J. Neurophysiol.* **82**(1):226-236.
  38. Lowe, G. y Gold, G.H. 1991. The spatial distributions of odorant sensitivity and odorant-induced currents in salamander receptor cells. *J. Physiol. (Lond)* **442**:147-168.
  39. Lowe, G. y Gold, G.H. 1993. Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* **366**:283-286.
  40. Lynch, J.P. y Barry, P.H. 1991. Slowly activating  $\text{K}^{+}$  currents in rat olfactory receptor neurons. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **244**:219-225.
  41. Miyamoto, T., Restrepo, D. y Teeter, J.J. y cols. 1992. Voltage-dependent and odorant regulated currents in isolated olfactory receptor neurons of the channel catfish. *J. Gen. Physiol.* **99**:505-529.
  42. Morales, B. 1995. Inhibición inducida por odorantes en neuronas olfatorias de *Caudiverbera caudiverbera*. Tesis de Doctorado, Fac. de Ciencias, U. de Chile.
  43. Morales B. y Bacigalupo, J. 1996. Chemical reception in vertebrate olfaction: evidence for multiple transduction pathways. *Biol. Res.* **29**:333-341.
  44. Morales, B., Labarca, P. y Bacigalupo, J. 1995. A ciliary  $\text{K}^{+}$  conductance sensitive to charybdotoxin underlies inhibitory responses in toad olfactory receptor neurons. *FEBS Lett.* **359**:41-44.
  45. Morales, B., Madrid, R. y Bacigalupo, J. 1997. Calcium mediates the activation of

- the inhibitory current induced by odorants in toad olfactory receptor neurons. *FEBS Lett.* **402**:259-264.
46. Morales, B., Ugarte, G., Labarca, P. y Bacigalupo, J. 1994. Inhibitory K<sup>+</sup> current activated by odorants in toad olfactory neurons. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **257**:235-242.
  47. Nakamura, T. y Gold, G.H. 1987. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* **325**: 442-444.
  48. Pace, U., Hanski, E., Salomon, Y. y Lancet, D. 1985. Odorant-sensitive adenilate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature* **316**:255-258.
  49. Pelosi, P. 1994. Odorant-binding proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**(3):199-228.
  50. Pelosi, P. 1996. Perireceptor events in olfaction. *J. Neurobiol.* **30**(1):3-19.
  51. Rossner, K.L y Freese, K.J. 1997. Bupivacaine inhibition of L-type calcium current in ventricular cardiomyocytes of hamster. *Anesthesiology* **87**:926-934.
  52. Sanhueza, M. y Bacigalupo, J. 1999. Odor suppression of voltage-gated currents contributes to the odor-induced response in olfactory neurons. *Am. J. Physiol.* **277** (*Cell Physiol.*): C1086-C1099.
  53. Sanhueza, M. Schmachtenberg, O. y Bacigalupo, J. 2000. Excitation, inhibition and suppression by odors in isolated toad and rat olfactory receptor neurons. *Am. J. Physiol.* **279** (*Cell Physiol.*): C31-C39.
  54. Schild, D. y Restrepo, D. 1998. Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol. Rev.* **78**:429-466.
  55. Sklar, P.B., Anholt, R.R. 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
  56. Smith, P. 1991. Caracterización de la actividad de adenilato ciclasa de cilios quimiosensores aislados del epitelio olfatorio de la rana chilena *Caudiverbera caudiverbera*. Tesis de Título, Bioquímica. Fac. Cs. Quim. y Farm. Univ. Chile.
  57. Steinbrecht, R.A. 1998. Odorant-binding proteins expression and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **855**:323-332.
  58. Trotier, D. 1986. A patch-clamp analysis of membrane currents in salamander olfactory receptor neurons. *Pfluegers Arch.* **407**:589-595.
  59. Vogler, C. y Schild, D. 1999. Inhibitory and excitatory responses of olfactory receptor neurons of *Xenopus leavis* tadpoles to stimulation with amino acids. *J. Exp. Biol.* **202**:997-1003.
  60. Zhainazarov, A.B. 1995. Odor induced currents in *Xenopus* olfactory receptor cell measured with perforated patch recording. *J. Neurophysiol.* **74**:479-483.