



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EXPRESIÓN DEL GEN DE LA CONEXINA 36 Y LA
DISTRIBUCIÓN DE SU PROTEÍNA EN DISTINTAS
CAPAS DEL BULBO OLFATORIO DE LA RATA**

VERÓNICA OLIVIA LASTRA GUERRA

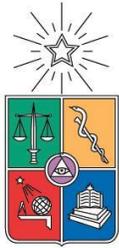
Memoria para optar al Título Profesional de
Médico Veterinario. Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

Profesor Guía: **DRA. MARÍA DE LA LUZ AYLWIN OSTALÉ.**

Proyecto Milenio ICM P01-007 F

Santiago, Chile

2007



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EXPRESIÓN DEL GEN DE LA CONEXINA 36 Y LA
DISTRIBUCIÓN DE SU PROTEÍNA EN LAS DISTINTAS
CAPAS DEL BULBO OLFATORIO DE LA RATA**

VERÓNICA LASTRA GUERRA

NOTA FINAL :

		NOTA	FIRMA
Profesor guía:	Dra. María de la Luz Aylwin Ostalé
Profesor consejero:	Dr. Luis Adaro Aravena
Profesor consejero:	Dr. Víctor Martínez Moncada

A mis padres, Olivia y José.

A mi esposo Alejandro.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y con especial cariño, a la Dra. Marilú Aylwin por haber depositado su confianza en mí para desarrollar este trabajo de investigación, por su constante motivación, ayuda, compañerismo y sincera amistad, con las cuales pude contar siempre.

A mis compañeros de y amigos de “lab”, Ximena, Guillermo, Gabriel, Christian Mazú y Christian López, por su ayuda y apoyo constante y principalmente por la amistad que con ellos formé y la cual espero perdure en el tiempo.

A quienes me ayudaron en el desarrollo de mi tesis, Cecilia Babúl, Dra. Eugenia Díaz, Carmen Alcayaga y Patricio Olguín, los que aportaron con sus conocimientos y experiencias en el desarrollo de las técnicas de este trabajo.

A mi familia por su incondicional apoyo y cariño en esta etapa y a lo largo de mi vida, lo que me ha permitido culminar con éxito este desafío.

Y a Alejandro por todo su amor y apoyo, no sólo en esta etapa, sino desde que estamos juntos y con quien espero seguir compartiendo mi vida.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Índice de ilustraciones y tablas	IV
1 Introducción	1
2 Revisión bibliográfica	2
2.1 El sistema Olfatorio	2
2.1.1 Generalidades	2
2.1.2 Anatomía del sistema olfatorio	3
2.1.2.1 Epitelio Olfatorio	3
2.1.2.2 Neurona Receptora Olfatoria	3
2.1.3 Transducción de las señales olfatorias	4
2.1.4 Generalidades del Bulbo Olfatorio	5
2.1.4.1 Anatomía del Bulbo Olfatorio	6
2.1.4.2 Oscilaciones y sincronía en el bulbo olfatorio (BO)	7
2.2 Sinapsis Eléctricas	8
2.3 Uniones en Hendidura (<i>Gap junction</i>)	9
2.3.1 Funciones de las uniones en hendidura	9
2.3.2 Regulación de la permeabilidad en las uniones en hendidura	11
2.4 Conexina 36 (Cx 36)	11
3 Hipótesis	13
4 Objetivos	13
4.1 Objetivo General	13
4.2 Objetivos Específicos	13
5 Materiales y Método	14
5.1 Animales de experimentación	14
5.2 Obtención de muestras	14
5.2.1 Protocolo Anestésico	14
5.2.2 Fijación del tejido	14
5.2.3 Corte del tejido	15

5.3 Inmunohistoquímica	16
5.3.1 Técnica de inmunohistoquímica en cortes montados	16
5.3.2 Técnica en Tejido Flotante	17
5.3.3 Protocolo	17
5.3.3.1 Preincubaciones	17
5.3.3.2 Incubación con anticuerpos	18
5.3.3.3 Inmunoperoxidasa y Diaminobenzidina	18
5.3.3.4 Montaje de las muestras	19
5.3.3.5 Controles negativos	20
5.4 Hibridización <i>in situ</i>	20
5.4.1 Digoxigenina	20
5.4.2 Métodos de marcaje para ARN	21
5.4.3 Tratamiento ARNsa	21
5.4.4 Preparación de la sonda de ARNm de conexina 36	21
5.4.4.1 Chequeo presencia inserto	22
5.4.4.2 Eliminación de bases	22
5.4.4.3 Purificación del ADN y Ligación	23
5.4.4.4 Transformación	23
5.4.4.5 Minipreparación plasmidial y purificación	23
5.4.4.6 Cuantificación del ADN	24
5.4.4.7 Transcripción	24
5.4.4.8 Precipitación de ARN	27
5.4.4.9 Medición de ARN	27
5.4.5 Aplicación de la sonda en los tejidos	27
5.4.5.1 Prehibridización	27
5.4.5.2 Hibridización	28
5.4.5.3 Bloqueo y permeabilización	28
5.4.5.4 Inmunohistoquímica	29
5.4.5.5 Revelado	29
5.4.5.6 Montaje de las muestras	29
5.5 Visualización y cuantificación Anticuerpo anti Conexina 36	30

5.6 Análisis Estadístico	32
6 Resultados	33
6.1 Presencia de la proteína Conexina 36 en las capas del bulbo olfatorio	33
6.2.2 Análisis estadístico	35
6.1.1.1 Animales de 14 días	35
6.1.1.2 Animales de 2 meses	38
6.2 Hibridación <i>in situ</i>	40
6.2.1 Resultados de la preparación de la sonda	40
6.2.1.1 Verificación del inserto	40
6.2.1.2 Acortamiento de DNA del inserto	41
6.2.1.3 Purificación de inserto y Minipreparación plasmidial	41
6.2.1.4 Linearización de las muestras	42
6.2.1.5 Purificación de sonda antisentido	43
6.2.1.6 Cuantificación del ADN	45
6.2.1.7 Transcripción y precipitación del ARN	45
6.2.1.8 Cuantificación de ARN	46
6.2.2 Presencia de ARNm en las capas del Bulbo Olfatorio	46
7 Discusión	48
7.1 Presencia de la proteína conexina 36 en las diferentes capas del BO	49
7.2 Expresión del ARNm para conexina 36 en las diferentes capas del BO	51
8 Conclusiones	53
9 Bibliografía	54

INDICE DE ILUSTRACIONES Y TABLAS

	Página	
Figura 1	Microfotografía áreas definidas para medición de marca con DAB	31
Figura 2	Microfotografías de cortes de BO y Oliva Inferior	33
Figura 3	Microfotografía de BO 14 días de edad	34
Figura 4	Gráfico intensidad de marca en animales de 14 días	37
Figura 5	Gráfico intensidad de marca en animales de 2 meses	39
Figura 6	Plasmidio p BlueScript con el inserto de conexina 36	40
Figura 7	Gel comprobación de inserto de Cx 36	40
Figura 8	Gel verificación de eliminación de bases	41
Figura 9	Gel purificación de ADN	41
Figura 10	Gel verificación de minipreparaciones plasmidiales	42
Figura 11	Gel verificación de linearización de sondas	42
Figura 12	Gel extracción de inserto	43
Figura 13	Gel pos purificación de bandas bajo inserto	43
Figura 14	Gel resultado de elaboración de sondas	44
Figura 15	Gel pos linearización con enzimas EcoRI e Hind III	44
Figura 16	Gel pos fenol	45
Figura 17	Gel pos resuspensión	46
Figura 18	Hibridización <i>in situ</i> , animal 14 días	47
Tabla N° 1	Tabla Análisis de Varianza animales de 14 días	35
Tabla N° 2	Resumen de Análisis Newman-Keuls, animales de 14 días	36
Tabla N° 3	Tabla Análisis de Varianza animales de 2 meses	38
Tabla N° 4	Resumen de Análisis Newman-Keuls, animales de 2 meses	39

RESUMEN

En el bulbo olfatorio (BO) se encuentra la primera sinapsis de la vía sensorial olfatoria cuya activación se distribuye posteriormente a los centros de integración sensorial, posibilitando la identificación y discriminación de las sustancias odoríferas. En el BO, existen las neuronas granulares de tipo inhibitorio cuya activación, inducida por estimulación olfatoria, genera oscilaciones del campo eléctrico en la banda gamma (30-100 Hz), permitiendo la discriminación de sustancias químicas de estructura similar. En la corteza cerebral, la actividad eléctrica oscilatoria depende de la presencia de sinapsis eléctricas entre las interneuronas inhibitorias conformadas por uniones en hendidura. Las conexinas (Cxs) son las unidades estructurales de las uniones en hendidura, de las cuales el tipo Cx 36 está involucrada en la generación de oscilaciones eléctricas en el sistema nervioso central. En conjunto, esta evidencia permite postular que las oscilaciones eléctricas en el BO podrían ser generadas por las uniones en hendidura formadas por conexina 36 entre las células granulares. El propósito de esta memoria fue determinar la presencia de la proteína conexina 36 en el BO y su distribución en las distintas capas del BO, a través de técnicas de inmunohistoquímica e hibridización *in situ*.

Contrariamente a lo esperado, los resultados muestran que la proteína Cx 36 se observa principalmente en las capas glomerular, plexiforme externa y mitral, para todas las muestras analizadas. Más aún, la distribución de la proteína entre animales juveniles y adultos es cualitativamente similar. Estos resultados indican que la proteína Cx 36 no se expresa en las células granulares y por lo tanto, no contribuyen a la formación de uniones en hendidura entre estas células que permitan explicar el origen de las oscilaciones de campo eléctrico en el BO. Sin embargo, estos resultados no descartan la posibilidad de que uniones en hendidura entre

las células de proyección y/o glomerulares, en las cuales sí se observa la expresión de la Cx 36, formen uniones en hendidura que permitan la interconexión eléctrica y por lo tanto la generación de oscilaciones del campo eléctrico en el BO.

SUMMARY

The first synapse of the olfactory sensory pathway is found in the olfactory bulb (OB) and its activation projects to the sensory integrative centers in the brain, contributing to the odorant identification and discrimination. Within the OB, there are inhibitory interneurons denominated granule cells whose activation, induced by olfactory stimulation, gives rise to oscillations of the local field potential in the gamma band (30-100 Hz), facilitating the discrimination of chemical substances of similar structure. In the cerebral cortex, the oscillatory electrical activity depends on the electrical synapses found between the inhibitory interneurons composed by gap junctions. Connexin proteins are the structural units that form gap junctions. Of these, Cx 36 has been shown to be involved in the generation of local field potential oscillations in the central nervous system. In summary, this evidence suggests that connexin 36 gap junctions between granule cells generate the OB electrical oscillations. The main objective of this thesis was to study the presence of the Cx 36 protein in the OB and its distribution within the different OB layers using immunohistochemical and in situ hybridization techniques.

Unexpectedly, the results show that Cx 36 protein is present in the glomerular, external plexiform and mitral cell layers in all samples analyzed. Furthermore, the results show that the Cx 36 protein expression was similar in juvenile and adults animals. These results indicate that the Cx 36 protein is not present in the granule cells, it does not contribute to the formation of

gap junctions between granule cells that will explain the oscillations observed in the OB. However, the results obtained in this thesis does not rule out the possibility that gap junctions between other OB cells as projection neurons or glomerular cells, where Cx36 protein is expressed, will form functional gap junctions that will support the electrical interconnection and therefore, the generation of local field potential oscillation in the OB.

1 INTRODUCCION

El sistema olfatorio es el principal sistema sensorial encargado de detectar e identificar sustancias químicas volátiles presentes en el ambiente y que están involucradas en actividades vitales para la supervivencia de los organismos terrestres como la detección de alimentos, reconocimiento de crías, posibles parejas sexuales y predadores, etc.

El proceso de reconocimiento de sustancias odoríferas comienza en el epitelio olfatorio, específicamente en las neuronas receptoras que transducen la unión del odorante a su receptor en señales eléctricas. Estas señales eléctricas viajan a través de los axones de las células receptoras hasta el bulbo olfatorio (BO) donde se conectan con las neuronas de segundo orden. Desde el bulbo olfatorio, las neuronas de segundo orden se proyectan en forma paralela al encéfalo anterior, la corteza cerebral, el hipotálamo y la amígdala, regiones en las cuales se integra la información olfatoria posibilitando la identificación y discriminación de las sustancias odoríferas.

En el bulbo olfatorio (BO), existen dos redes inhibitorias que modulan la actividad de las neuronas que se proyectan al encéfalo y cumplen un rol fundamental en el procesamiento de las señales olfatorias, particularmente en los procesos de identificación de odorantes y discriminación fina de odorantes, en especial aquellos de estructura química similar. La actividad de esta red de neuronas inhibitorias permite la generación de actividad oscilatoria principalmente en la banda gamma (30-100 Hz) asociada a la presencia de estímulos olfatorios, proporcionando así la generación de una actividad basal que permite la actividad sincrónica de aquellas neuronas que están siendo activadas por un odorante.

En la corteza de roedores se ha demostrado que esta oscilación en la banda gamma es mediada por la actividad sincrónica de la red de neuronas inhibitorias, la cual depende de la presencia de conexiones eléctricas mediadas por uniones en hendidura (*Gap junction*). Las uniones en hendidura son canales intercelulares entre células adyacentes responsables del acoplamiento eléctrico entre neuronas. Estas estructuras están conformadas por proteínas conexas (Cx) de las cuales un tipo, la conexina 36, ha sido identificada en cerebros de

mamíferos y es la que se encuentra en mayor concentración en las células neuronales de regiones específicas del cerebro.

El propósito de esta memoria es contribuir al entendimiento de los mecanismos involucrados en el proceso de discriminación olfatoria a nivel del bulbo olfatorio; en particular el rol que cumple la proteína conexina 36 en la red neuronal presente en este órgano.

2 REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1 El sistema Olfatorio

2.1.1 Generalidades

El sistema olfatorio codifica información acerca de la identidad molecular y la concentración de una amplia gama de estímulos químicos. Estos estímulos, u odorantes, interactúan con las neuronas receptoras olfatorias en una lámina epitelial, el epitelio olfatorio, que reviste el interior de la nariz. Las neuronas receptoras olfatorias envían sus axones directamente al bulbo olfatorio. A su vez, las neuronas del bulbo olfatorio se proyectan a varias estructuras del encéfalo anterior, que incluyen el hipotálamo, la amígdala y la corteza cerebral. Estas distintas regiones encefálicas median la identificación de las sustancias odoríferas, así como las reacciones emocionales y la respuestas motoras a los estímulos químicos (Purves *et al.*, 2001).

El sistema olfatorio al igual que otras modalidades sensoriales, comienza con el proceso de transducción de los estímulos químicos a señales neuronales que luego son transmitidos hacia el encéfalo. Sin embargo, existen algunas diferencias importantes entre el sistema olfatorio y otras vías sensoriales. Tanto en el sistema somatosensitivo como en el sistema visual, las distintas características del estímulo (forma y movimiento, por ejemplo) son transmitidas centralmente por vías paralelas. En el caso del sistema olfatorio, no está claro si existen distintas submodalidades y si su procesamiento es mediante vías paralelas. Más aún, la representación central de los odorantes es aún un problema no resuelto en la modalidad olfatoria. Los mapas topográficos en las cortezas somatosensitiva o visual que reflejan la geometría y la organización funcional de la superficie receptora, no existen en ninguna forma obvia en las áreas olfatorias del sistema nervioso central (Purves *et al.*, 2001).

2.1.2 Anatomía del sistema olfatorio

2.1.2.1 Epitelio Olfatorio

La transducción de los estímulos químicos se lleva a cabo en el epitelio olfatorio (Purves *et al.*, 2001). El proceso de percepción olfatoria comienza con la unión odorante-proteína receptora en el epitelio olfatorio, el cual en los vertebrados representa una superficie sensorial formada de tres tipos de células distintas morfológicamente y también en sus propiedades eléctricas (Latorre *et al.*, 1996). La más importante de ellas es la neurona receptora olfatoria, una neurona bipolar que da origen en su superficie basal a un axón amielínico de pequeño diámetro que transmite el patrón de potenciales de acción hasta el encéfalo. En su superficie apical, la neurona receptora da origen a una prolongación única que se expande en una protrusión similar a un botón desde el cual se extienden varias microvellosidades, denominadas cilios olfatorios, en la capa gruesa de moco que reviste la cavidad nasal y controla el medio iónico de los cilios olfatorios. El moco es producido por especializaciones secretorias denominadas glándulas de Bowman que están distribuidas en todo el epitelio. Se presentan también otras dos clases, las células sustentaculares (de sostén) y las células basales que dan origen constantemente a nuevas células receptoras (Purves *et al.*, 2001). Las células receptoras olfatorias crecen, mueren y son reemplazadas continuamente en un ciclo que dura aproximadamente 4-8 semanas, lo que constituye una excepción en el sistema nervioso (Bear *et al.*, 1998).

2.1.2.2 Neurona Receptora Olfatoria

Las proteínas receptoras olfatorias son las responsables de la especificidad de la transducción de los estímulos olfatorios. Cada una de éstas expresan uno de los 1.000 genes distintos para receptores odoríferos, lo que explicaría la gran cantidad de odorantes de estructura química diferente que pueden ser discriminados por el sistema olfatorio. Las moléculas receptoras olfatorias son homólogas de una familia grande de receptores ligados a la proteína G que incluyen los receptores beta adrenérgicos y la opsina de los bastones. Como característica común, todas las proteínas receptoras odoríferas tienen siete dominios hidrofóbicos que atraviesan la membrana de la célula donde se distinguen un dominio

extracelular capaz de interactuar con los compuestos químicos odoríferos y un dominio citoplasmático, que en la región terminal carboxilo tiene la capacidad de interactuar con la proteína G (Purves *et al.*, 2001).

Los odorantes disueltos en el mucus se unen a los receptores localizados en la superficie de los cilios y activan el proceso de transducción que causa una modificación de la frecuencia de potenciales de acción en estas células. Después de abandonar el epitelio, los axones penetran en una fina lámina de hueso etmoides, denominada lámina cribosa, para alcanzar el bulbo olfatorio (Bear *et al.*, 1998). Se ha propuesto que las proteínas receptoras cumplen una segunda función, como guía para el crecimiento de los nuevos axones hacia el glomérulo en el bulbo olfatorio. Si esto no ocurriese así, probablemente la percepción de un odorante cambiaría entre mes y mes en concordancia con la renovación celular (Alberts *et al.*, 2002).

Cada célula receptora responde a varios tipos de odorantes indicando que los receptores tienen una curva de sintonía a odorantes más bien amplia. Por otra parte cada odorante puede activar varios tipos de receptores diferentes de manera que se postula que los receptores en su conjunto median una codificación de tipo combinatoria de los estímulos químicos (Malnic *et al.*, 1999).

2.1.3 Transducción de las señales olfatorias

Los cilios del epitelio olfatorio poseen una proteína G, cuya expresión está restringida al epitelio olfatorio, denominada G_{olf} . La activación de esta G_{olf} mediante la unión del estímulo a su receptor olfatorio activa la proteína G en los cilios olfatorios activando a su vez a la adenil ciclasa. Esta activación se observa en presencia de una variedad de odorantes pertenecientes a los grupos herbáceos, mentáceos y frutales, aunque algunos odorantes pertenecientes a estas categorías no estimulan a la adenil ciclasa (Latorre *et al.*, 1996). La estimulación de la adenil ciclasa conduce a un incremento en los niveles de AMPc, el cual activa un canal catiónico no selectivo que permite el paso de iones de sodio, potasio y calcio. La apertura de estos canales produce la despolarización de la neurona. Esta despolarización inicial es amplificada por una corriente de cloro activada por calcio y es conducida pasivamente desde los cilios hasta la

región del cono axónico de la neurona receptora olfatoria, donde se originan los potenciales de acción y se transmiten al bulbo olfatorio.

2.1.4 Generalidades del Bulbo Olfatorio

La información sensitiva recogida en la nariz se transmite a los bulbos olfatorios, estructuras pares situadas inmediatamente por encima y por detrás de las cavidades nasales. En el bulbo olfatorio, los axones sensitivos aferentes establecen sinapsis con las dendritas de las principales neuronas del bulbo, en unidades sinápticas separadas anatómicamente denominadas glomérulos, de los cuales existen alrededor de 2000 en cada bulbo en el ratón. En el glomérulo, el axón sensitivo establece conexiones sinápticas con tres tipos distintos de células: mitrales y en penacho, neuronas que proyectan sus axones a la corteza olfatoria e interneuronas periglomerulares que rodean el glomérulo. El axón de cada neurona sensitiva olfatoria sólo establece sinapsis en un glomérulo. Del mismo modo, la dendrita primaria de cada neurona mitral y en penacho se limita a un sólo glomérulo. En cada glomérulo, los axones de varios miles de neuronas sensitivas convergen sobre las dendritas de alrededor de 20 a 50 neuronas de proyección, por lo que el número de neuronas que transmiten las señales sensoriales olfatorias se reduce considerablemente conformando un alto grado de convergencia a este nivel (Kandel *et al.*, 2000).

La presencia de glomérulos en el bulbo olfatorio hizo pensar en un principio que éstos podrían actuar como unidades funcionales y que la actividad producida por odorantes diferentes podría localizarse en glomérulos distintos. La exposición de un animal a odorantes distintos al mismo tiempo que se registra la actividad de una sola célula mitral apoya esta hipótesis. Cada célula mitral responde a múltiples odorantes, pero las células mitrales conectadas a distintos glomérulos suelen responder a distintos grupos de odorantes. Se ha demostrado que cada odorante estimula muchos glomérulos distintos (Kandel *et al.*, 2000).

En el BO existen 2 redes inhibitorias, una a nivel de los glomérulos y otra a nivel de las dendritas secundarias de las células mitrales y en penacho. Estas redes inhibitorias tienen una función de inhibición lateral por una parte y también de retroinhibición sobre las células mitrales y en penacho. Además de las conexiones sinápticas entre los diferentes tipos de células del bulbo olfatorio, podría existir acoplamiento eléctrico entre algunos tipos celulares contribuyendo a la sincronización de la descarga neuronal. Esos mecanismos proveen

numerosas opciones para la modulación dinámica y el control de las señales en el BO.

2.1.4.1 Anatomía del Bulbo Olfatorio

En los seres humanos, el bulbo olfatorio es relativamente pequeño. En otros mamíferos, es comparativamente más grande con respecto a otras regiones del encéfalo anterior. Estas diferencias en tamaño relativo probablemente se relacionan con diferencias en las capacidades olfatorias de las distintas especies (Purves *et al.*, 2001).

El BO es una estructura estratificada esférica que contiene (desde la periferia hacia el centro) las siguientes capas: del nervio olfatorio, glomerular, plexiforme externa, mitral y granular.

Capa Nervio Olfatorio. Los axones de las células receptoras olfatorias que abandonan el epitelio olfatorio, convergen formando el nervio olfatorio el cual se proyecta directamente al BO.

Capa Glomerular. Contiene numerosas estructuras esféricas denominadas glomérulos, o neuropilos formados por la estructura apical de las dendritas de las células mitrales y en penacho (células de proyección), los árboles axonales formados por los axones de las neuronas receptoras olfatorias y dendritas y axones de las interneuronas periglomerulares. Las neuronas olfatorias expresan un sólo tipo de proteína receptora olfatoria y las células que expresan el mismo receptor convergen en sólo 2 glomérulos en cada bulbo olfatorio. En el glomérulo, las aferencias olfatorias sensoriales primarias provenientes de neuronas receptoras hacen sinapsis de tipo excitatorio con los procesos dendríticos de las células mitrales y en penacho e interneuronas. La diferencia morfológica entre las células mitrales y en penacho sugiere que ambas son funcionalmente distintas y pueden cumplir funciones diferentes en la percepción olfatoria (Macrides *et al.*, 1985; Mori 1987).

Capa Plexiforme Externa. Conformada por procesos dendríticos de células granulares que hacen sinapsis recíprocas con las dendritas secundarias de células mitrales y en penacho, en las cuales las células mitrales liberan glutamato (neurotransmisor excitatorio) y las células granulares liberan ácido gama amino butírico (GABA, neurotransmisor inhibitorio).

Capa Mitral. Contiene los cuerpos neuronales de las células mitrales, cuyos axones se proyectan a centros de integración de la respuesta olfatoria en el cerebro.

Capa Granular. Conformada principalmente por células granulares de 6-8 μm de diámetro, las cuales no poseen axón. Dada esta característica, estas células ejercen su acción inhibitoria sobre las células en penacho y mitrales a través de sinapsis dendrodendríticas bidireccionales.

2.1.4.2 Oscilaciones y sincronía en el bulbo olfatorio (BO)

Una de las preguntas fundamentales en los sistemas sensoriales es de que manera las distintas propiedades de los objetos son codificados en señales neuronales. En particular en el sistema olfatorio de que manera los distintos compuestos químicos son codificados en las diferentes estructuras del sistema olfatorio permitiendo la identificación y discriminación de ellos. El bulbo olfatorio constituye la primera estructura donde se procesa la actividad gatillada por odorantes en el epitelio olfatorio. Una serie de estudios iniciales en los que se lesionaron regiones cada vez más amplias del BO determinaron que la información olfatoria estaba distribuida en esta estructura, de manera que una lesión de una zona restringida del BO no producía efectos específicos, como la pérdida de la percepción de un compuesto determinado (Freeman, 1978). Posteriormente, se midió la actividad eléctrica del BO en conejos y se describió la presencia por primera vez de oscilaciones en el rango gamma (30 a 100 Hz) producidas en presencia de odorantes. Basándose en esta evidencia, se postuló que estas oscilaciones eran fundamentales en la codificación de los odorantes en el BO. Posteriormente, se propuso que estas oscilaciones cumplirían un rol fundamental en el fenómeno de discriminación e identificación olfatoria, permitiendo la generación de actividad sincrónica a nivel del BO de aquellas neuronas que son activadas por un mismo odorante. La actividad oscilatoria se ha mostrado en muchas otras regiones del SN y en algunas de las cuales se ha demostrado que es importante en los procesos de “binding” perceptual por el cual se agrupan los elementos que pertenecen a un objeto, como ocurre en la corteza visual (Engel y Singer, 2001).

El origen de la actividad oscilatoria ha sido estudiado en otras regiones del SN. En la corteza cerebral, las oscilaciones surgen en parte por el acoplamiento eléctrico que existe entre las interneuronas inhibitorias (Galarreta y Hestrin, 2001). En el BO, las oscilaciones podrían ser originadas en parte por variaciones intrínsecas del potencial de membrana de las neuronas mitrales o en penacho. Por otra parte la conectividad sináptica recíproca entre las neuronas del BO contribuiría también a la generación de estas oscilaciones. A pesar de la evidencia

obtenida en otras regiones del sistema nervioso, donde las uniones en hendidura juegan un rol importante en la generación de actividad oscilatoria, no se ha explorado exhaustivamente posibles mecanismos de acoplamiento eléctrico en el BO que pudieran contribuir a la generación de oscilaciones en la banda gamma como ocurre en la corteza cerebral.

2.2 Sinapsis Eléctricas

En las sinapsis eléctricas, las membranas de las neuronas se encuentran muy próximas entre sí. En esta región existe un tipo especial de contacto intercelular denominado unión en hendidura (*gap junction*) que constituye una sinapsis de tipo eléctrico. Las uniones en hendidura están conformadas por canales apareados y alineados con precisión en la membrana de cada neurona, de modo que cada par de canales forma un poro que comunica ambas células. El poro de un canal de una unión en hendidura es de mayor tamaño que un canal iónico regulado por voltaje, por lo cual distintas sustancias pueden difundir fácilmente entre el citoplasma de las neuronas presinápticas y postsinápticas (Purves *et al.*, 2001).

En las sinapsis eléctricas, la corriente se desplaza entre las células en forma bidireccional. Un potencial de acción generado en la célula presináptica, produce una respuesta similar en la otra célula aunque de menor amplitud. La latencia, o tiempo entre la señal presináptica y la respuesta postsináptica, es notablemente más corta que una sinapsis química, que normalmente requiere de varios milisegundos que dependen de la liberación de un neurotransmisor por la neurona presináptica, la difusión de éste a la célula postsináptica, su unión con el receptor específico y apertura o cierre de los canales iónicos.

En una transmisión eléctrica, el cambio de potencial de la célula postsináptica está en directa relación con la magnitud y la forma del cambio de potencial en la célula presináptica. Cualquier magnitud de corriente en la célula presináptica desencadena una respuesta en la célula postsináptica, incluso si esta magnitud se encuentra por debajo del umbral para un potencial de acción (Kandel *et al.*, 2000).

Dentro de las características importantes de este tipo de sinapsis, destaca que la transmisión entre células puede ser bidireccional, es decir la corriente puede fluir en cualquier dirección a través de la unión en hendidura, dependiendo de en que célula se desencadena un cambio de potencial de membrana (aunque existen algunas excepciones donde las uniones en hendidura sólo presentan transmisiones unidireccionales). Además la transmisión entre células

es extraordinariamente rápida puesto que el flujo pasivo de corriente a través de la unión en hendidura es casi instantáneo, permitiendo la sincronización de la actividad eléctrica entre poblaciones neuronales (Purves *et al.*, 2001)

2.3 Uniones en Hendidura (*Gap junction*)

Históricamente, las uniones en hendidura fueron descritas histológicamente y posteriormente se pudo verificar que estas estructuras estaban compuestas por canales que unen células entre sí y que permiten la transferencia de señales eléctricas entre células excitables como también muchos compuestos celulares de tamaño pequeño (Rozental *et al.*, 2000). Estudios recientes de mutaciones en conexinas humanas y en ratones *knockout* para conexinas han demostrado que la función de los canales formados por las uniones en hendidura intercelulares es coordinar la actividad celular. Ejemplos incluyen la propagación intercelular de segundos mensajeros, señales bidireccionales entre oocitos y células de la granulosa para coordinar la maduración de los folículos ováricos y la mantención del balance osmótico en la homeostasis del cristalino. El estudio de mutaciones en las conexinas de los canales intercelulares en humanos, ha mostrado que los defectos se asocian con varias enfermedades genéticas, aunque los mecanismos sean aún desconocidos.

Cada canal intercelular está formado por la unión de dos hemicanales o conexones, formados cada uno por el ensamblaje de seis subunidades proteicas llamadas conexinas. Las conexinas son codificadas por una gran familia multigénica y hoy se conocen 16 diferentes miembros de esta familia en mamíferos (Belluardo *et al.*, 2000). Se han descrito tres grupos de conexinas, Grupo I (β) que incluye las conexinas Cx 26, Cx 30, Cx 30.3, Cx 31, Cx 31.1 y Cx 32; Grupo II (α) de conexinas incluye Cx 33, Cx 37, Cx 40, Cx 43, Cx 45, Cx 46, Cx 50 y la mayoría de las recientemente descritas Cx 57. Además la Cx 36, un nuevo tipo de conexina, se ha identificado en cerebros de mamíferos, particularmente en células neuronales y ha sido asignada al nuevo grupo III o γ (Rozental *et al.*, 2000).

2.3.1 Funciones de las uniones en hendidura

En los tejidos que presentan células excitables, el acoplamiento entre células vía uniones en hendidura se encuentra en algunos de los tipos celulares. Algunas células nerviosas están acopladas eléctricamente, permitiendo la rápida difusión de los potenciales de acción

desde una células a otra, sin el retraso que se aprecia en las sinapsis químicas. Esta característica es una ventaja cuando rapidez y seguridad de respuesta son cruciales, como en ciertas respuestas de escape en peces e insectos. En vertebrados, el acoplamiento eléctrico a través de uniones en hendidura sincroniza la contracción tanto de células musculares cardíacas como de músculo liso responsable de los movimientos peristálticos en el intestino.

Las uniones en hendidura también están presentes en tejidos que no poseen células excitables eléctricamente. En el hígado, por ejemplo, la liberación de noradrenalina desde el nervio simpático desencadena una respuesta de disminución en los niveles de glucosa en la sangre, estimulando a los hepatocitos a incrementar la degradación de glicógeno y con ello aumentar los niveles de glucosa en el cuerpo. No todos los hepatocitos están inervados por el nervio simpático, sin embargo a través de las uniones en hendidura se logra la transmisión de la señal desde células inervadas a células no inervadas. Se ha demostrado que en ratones con mutaciones genéticas que afectan la expresión de la mayoría de las conexinas en el hígado, se produce una alteración en la movilización normal de glucosa cuando los niveles corporales de ella descienden (Alberts *et al.*, 2002).

El desarrollo normal de los folículos ováricos también depende de la comunicación a través de uniones en hendidura, en este caso, entre el ovocito y su entorno de células granulosas. Una mutación en los genes que codifican las conexinas que normalmente participan en el acoplamiento de estos dos tipos celulares causa infertilidad.

El acoplamiento celular a través de uniones en hendidura tiene gran importancia en la embriogénesis. En vertebrados, la etapa temprana se inicia con el estadio de ocho células, en el cual la mayoría de las células están eléctricamente acopladas unas con otras. Ya en etapa de embrión, grupos específicos de células desarrollan distintas identidades y comienzan a diferenciarse; comúnmente desacoplándose del tejido circundante. Por ejemplo, la placa neural se invagina para formar el tubo neural para lo cual las células se desacoplan del ectoderma subyacente. Mientras tanto, las células dentro de cada grupo específico permanecen acopladas unas con otras tendiendo a comportarse como un ensamblaje cooperativo, todas siguiendo un camino de desarrollo coordinado.

2.3.2 Regulación de la permeabilidad en las uniones en hendidura

Tal como los canales iónicos convencionales, los canales formados por uniones en hendidura no permanecen continuamente abiertos, sino fluctúan entre estados de apertura y cierre. Agentes como el calcio y cambios de pH inducen el cierre de los canales. Esto demuestra que se trata de estructuras dinámicas que están sometidas a factores reversibles que cierran el canal en respuesta a cambios en la célula. El mecanismo de acción del pH en la regulación de la permeabilidad no está muy claro aún, no así en el caso del calcio, del cual se sabe que cuando una célula ha sido dañada, su membrana plasmática presenta alteraciones permitiendo que iones presentes en altas concentraciones en el fluido extracelular, tales como calcio y sodio se movilicen al interior de la célula, con la consiguiente pérdida de otros metabolitos. Si esta célula dañada permaneciera acoplada a células vecinas que no presentan daño, ellas podrían sufrir también esta alteración química interna. Sin embargo, la masiva entrada de calcio a la célula dañada provoca que los canales conformados por uniones en hendidura se cierren inmediatamente, logrando el efectivo aislamiento de ésta y previniendo la extensión del daño a células vecinas (Alberts *et al.*, 2002).

Las uniones en hendidura también pueden ser reguladas por señales extracelulares. El neurotransmisor dopamina por ejemplo, reduce la comunicación entre uniones en hendidura de una clase de neuronas en la retina en respuesta a incrementos en la intensidad de la luz. Esta reducción en la permeabilidad de las uniones en hendidura, ayuda a la retina a cambiar entre el sistema de los bastones, muy sensibles a intensidades bajas de luminosidad, a los conos, los cuales detectan distintas longitudes de onda, y viceversa.

2.4 Conexina 36 (Cx 36)

En el sistema nervioso, diferentes tipos de conexinas se expresan en células neuronales y gliales. Entre esas, la Cx 36 ha emergido como una subunidad que parecía estar expresada exclusivamente en neuronas, pero un estudio reciente sugiere la idea que podría cumplir un rol funcional también entre células excitables del páncreas y la glándula adrenal (Degen *et al.*, 2004). La Cx 36 parece no formar parte de los canales de unión en hendidura con otros tipos de conexinas (uniones en hendidura heterotípicas). Estudios sugieren que la Cx 36 forma

sinapsis eléctricas y electroquímicas entre neuronas en el sistema nervioso central y se ha determinado que es crítica para la formación de uniones en hendidura funcionales en la mayoría de las interneuronas de la neocorteza (Deans *et al.*, 2001).

A pesar de la baja unidad de conductancia de los canales de uniones en hendidura con Cx 36, inyecciones del colorante amarillo de Lucifer demostraron que esos canales son permeables a aniones tan grandes como algunas moléculas que actúan como segundos mensajeros, tales como IP₃ y AMPc. Estos hallazgos indican que los canales de Cx 36 pueden proveer el sustrato para el acoplamiento bioquímico observado en neuronas neocorticales, los cuales están implicados en el establecimiento de conexiones sinápticas postnatales (Srinivas *et al.*, 1999).

Los resultados de la expresión de ARNm y la proteína conexina 36 en el BO han sido poco congruentes. Por una parte el BO es una de las pocas regiones en el sistema nervioso central que exhibe abundante expresión de ARNm de Cx 36 en ratones adultos (Hormuzdi *et al.*, 2001) determinado mediante hibridización *in situ* con métodos reactivos. El RNA mensajero codificado para Cx 36 fue localizado en cuerpos de células periglomerulares y mitrales, indicando que la proteína debiera estar presente en la capa mitral y plexiforme externa como en el glomérulo, sin embargo el ARNm no estaba presente en glomérulo. Por otra parte la proteína se encontró en altos niveles en el interior del glomérulo y en menor medida, en el estrato de células mitrales y a lo largo del límite entre éste y el estrato plexiforme externo (Belluardo *et al.*, 2000). Adicionalmente, datos obtenidos mediante hibridización *in situ* en ratas utilizando un ADNc de ratón e inmunohistoquímica con un anticuerpo comercial (Zymed[®]) para Cx 36, mostraron la expresión de esta proteína principalmente en la región glomerular (Zhang y Restrepo, 2003).

De esta manera, es importante determinar la distribución y niveles relativos de la proteína Cx36 en las distintas capas del bulbo olfatorio, para posteriormente identificar regiones donde pueda existir acoplamiento eléctrico entre las neuronas.

3 HIPÓTESIS

La presencia de la proteína conexina 36 en el BO y específicamente en la capa granular, permite la generación de oscilaciones gamma descritas en esta estructura, contribuyendo de este modo en el proceso de discriminación de odorantes y en particular, aquellos de estructura química similar.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el patrón de expresión del gen de la conexina 36 y la distribución y niveles relativos de su proteína, en las distintas capas del bulbo olfatorio de la rata

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia y localización del ARNm para Cx 36 en las distintas capas del BO de la rata.
- Determinar la presencia y localización de la proteína Cx 36 en las distintas capas del BO de la rata.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

Todas las etapas de experimentación de este proyecto se realizaron de acuerdo al protocolo CBA N° 081, aprobado por el Comité de Bioética sobre investigación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile

5.1 Animales de experimentación

Se utilizó la rata (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley. Se escogió esta especie por ser el modelo vertebrado más utilizado en los estudios del sistema olfatorio y del cual se conoce ampliamente su neuroanatomía, además de su facilidad de manejo, adecuado tamaño y disponibilidad en el bioterio.

Se utilizaron 6 animales de sexo masculino, 3 de 14 días y 3 de 2 meses, cuyos pesos fluctuaban entre los 35-280 g respectivamente, adquiridos tanto desde el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile como del Bioterio de la Universidad Católica de Chile. Los tejidos que se emplearon fueron el bulbo olfatorio (BO) y como control positivo la oliva inferior (OI).

5.2 Obtención de muestras

5.2.1 Protocolo Anestésico

Para lograr un estado de anestesia profunda durante los procesos quirúrgicos, se empleó el siguiente protocolo:

- Premedicación con acepromacina en dosis de 0.75 mg/kg, vía intraperitoneal.
- Inducción anestésica con una asociación de ketamina en dosis de 35 mg/kg y xilacina en una dosis de 2 mg/kg, administradas vía intraperitoneal.
- El nivel de anestesia fue monitoreado mediante la respuesta a una compresión de la membrana interdigital entre los dedos de la extremidad anterior que normalmente produce el reflejo flexor.

5.2.2 Fijación del tejido

Luego de constatar un estado de anestesia profunda, se sostuvo el animal en una placa en posición decúbito dorsal sujetado por sus 4 extremidades. Luego se realizó una incisión en la cavidad torácica y luego se despejó el corazón. Posteriormente, se realizó un corte en la aurícula derecha para permitir la salida del circuito sanguíneo desde el retorno venoso y otro corte en el ápice del corazón para acceder al ventrículo izquierdo, por donde se introduce una aguja recubierta en su punta con acrílico dental, que impide la laceración del tejido. Esta aguja se conecta mediante una manguera plástica con el sistema de perfusión. Inmediatamente se comienza la perfusión con una solución salina (NaCl 0.9%) para lavar los órganos y tejidos, eliminando la sangre, en una cantidad aproximada de 100 ml en el caso de animales de 2 meses y 40-50 ml en los de 14 días a una velocidad aproximada de 10 ml /min. Como un referente del estado del lavado con NaCl, se observa el color del hígado que cambia de rojo intenso a naranja pálido a medida que se va reemplazando la sangre de los vasos. Una vez terminada la perfusión salina, se perfunde con la solución fijadora, constituida de paraformaldehído 4% (PAF) en el caso de experimentos de inmunohistoquímica y 3% para hibridaciones *in situ*. Una adecuada fijación de los tejidos produce en su etapa inicial espasmos correspondientes a fibrilaciones masivas provocados por acción del líquido fijador en la musculatura esquelética, además se observa una paulatina rigidez del cuello, extremidades y cola. Para lograr un grado de fijación adecuado debe perfundirse un volumen aproximado de PAF de 300 ml en el caso de los adultos y 150-200 ml en el caso de los juveniles. El animal es sacrificado en este procedimiento.

5.2.3 Corte del tejido

Una vez fijado el animal, se extraen el cerebro, los bulbos olfatorios y el tronco encefálico desde donde se obtiene la oliva inferior (OI). Éstos son introducidos en la misma solución fijadora por un período de 24 horas como mínimo para lograr el grado de fijación necesaria para los procesos de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. Luego son traspasados a una solución criopreservante de 30% sacarosa por alrededor de 2 días. Inicialmente, debido a la diferencias de densidades el cerebro queda flotando, pero luego que la solución de sacarosa penetra al tejido, éste se va al fondo del recipiente que lo contiene indicando que la solución de sacarosa ha logrado penetrar completamente el tejido. La

solución de sacarosa es preparada con agua destilada para inmunohistoquímica y agua tratada con dietilpirofosfato (DEPC) para hibridaciones *in situ*. Esta acción crioprotectora sobre el tejido es fundamental en el crióstato, que funciona a temperaturas de aproximadamente -20 a -25°C .

Previo al corte del tejido, éste debe montarse con una solución Tissue Freezing Medium[®], que le confiere rigidez al tejido. Los cortes obtenidos son depositados en solución tampón salina de fosfato (PBS 0.01 M) en una placa de cultivo.

5.3 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica permite observar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Se basa en la capacidad del anticuerpo de unirse específicamente a su antígeno. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo a su vez, está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración. Generalmente se utilizan como marcadores enzimas capaces de cambiar de color un sustrato incoloro. Las enzimas más frecuentemente utilizadas son peroxidasa y fosfatasa alcalina y los sustratos diaminobenzidina (color marrón), aminoetilcarbazol (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden unirse (conjugarse) directamente al anticuerpo primario o bien indirectamente mediante otros anticuerpos (secundarios) o sustancias como biotina o proteína A.

Las técnicas inmunohistoquímicas enzimáticas permiten una localización más precisa de las reacciones, ya que la tinción es permanente y estable, puede contrastarse y puede ser evaluada con microscopía de luz. Además los cortes pueden mantenerse por años sin pérdida de la intensidad de la reacción.

Esta técnica requiere de controles internos o paralelos, usualmente positivos y negativos. El control negativo se obtiene realizando la misma técnica, pero con omisión del paso de incubación con anticuerpo primario con el objeto de determinar la unión del anticuerpo secundario en forma inespecífica. El control positivo consiste en un experimento con un tejido que tenga el antígeno presente para comprobar que el sistema de anticuerpo y marca funcionan reconociendo el antígeno apropiado.

5.3.1 Técnica de inmunohistoquímica en cortes montados

En una primera etapa, se realizó la inmunohistoquímica utilizando cortes montados sobre portaobjetos previamente gelatinizados con un tratamiento de pasadas consecutivas por una solución de gelatina (gelatina 10% y cromo alumbre 0.1%). Luego, con un lápiz hidrofóbico (Dako Pen[®]) se hace un círculo que delimite los cortes para realizar las reacciones de inmunohistoquímica. Como anticuerpo primario utilizamos el monoclonal anticonexina 35/36 producido en ratón (Chemicon[®], N° Catálogo MAB3045), pero el resultado de los experimentos en cuanto a la integridad del tejido y la intensidad y especificidad de la marca no fue el óptimo, probablemente debido a reacciones del anticuerpo secundario anti-ratón con antígenos inespecíficos de la rata, dada la cercanía entre especies.

5.3.2 Técnica en Tejido Flotante

Debido a los resultados inaceptables obtenidos con la técnica de inmunohistoquímica en cortes montados, se implementó la técnica de inmunohistoquímica en tejido flotante consistente en colocar los cortes obtenidos inmediatamente en una placa de cultivo suspendidos en solución tampón salina de fosfato (PBS) donde se realizan todas las reacciones de modo que están permanentemente sumergidos en líquido, a diferencia de la técnica de tinción en cortes montados. Observé algunas ventajas de esta técnica en comparación con la de cortes montados, en primer lugar, una mayor integridad del tejido, además la marca es también mas intensa ya que los anticuerpos penetran por ambos lados del corte.

Por otra parte, debido al grado de tinción inespecífica observada en los experimentos iniciales, utilizamos otro anticuerpo primario, el policlonal anticonexina 36 producido en conejo (Zymed[®] N° catálogo 51-6200).

5.3.3 Protocolo

5.3.3.1 Preincubaciones

Los cortes de 30 µm de grosor se depositaron en pocillos en un número aproximado de 6-8 cortes/pocillo. Luego se removió la solución de montaje Tissue Freezing Medium[®]; mediante 2 lavados de 5 minutos con solución tampón salina de fosfato (PBS 0.01 M). Posteriormente, se realizó el bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena mediante la

incubación de los cortes por 20 minutos con una solución de 0.3% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y 99.7% de PBS 0.01 M.

Luego se bloquean los antígenos inespecíficos junto con la permeabilización de los cortes, incubándolos por 30 minutos con 10% de suero normal de cabra (NGS), 0.3% de Tritón X-100[®] y un 89.7% de solución tampón fosfato (PBS 0.01 M).

5.3.3.2 Incubación con anticuerpos

El anticuerpo primario anti conexina 36 de tipo policlonal se incubó toda la noche (12 horas a 4°C) en un agitador orbital. Para determinar la concentración del anticuerpo necesario para producir una tinción específica óptima, fue preciso probar distintas diluciones y tiempos de incubación. De acuerdo a las indicaciones de la compañía, una concentración de 2 µg/ml que corresponde a una dilución de 1:100 es la adecuada para una marcación óptima. Los experimentos se realizaron con diluciones de 1:50, 1:100 y 1:200. Además se probó también con 2 tiempos de incubación del anticuerpo de 12 y 18 horas. Los resultados mostraron que la tinción más específica e intensa se lograba con la dilución 1:100 sin diferencias claras con diferentes horas de incubación. Por lo tanto se escogió trabajar con un período de 12 horas.

Posteriormente se realizan 3 lavados de 10 minutos con solución tampón fosfato (PBS 0.01 M) para sacar todo el anticuerpo primario unido inespecíficamente. Luego se realiza un segundo bloqueo con 10% de suero normal de cabra (NGS), 1% de suero albúmina de bovino (BSA) y 89% de PBS 0.01 M, por una hora a temperatura ambiente.

Finalmente se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo elaborado en cabra (Vector[®] N° catálogo BA-1000) por una hora a temperatura ambiente a una concentración de 1:200, en una solución PBS con 5% de suero normal de cabra (NGS), 3% de suero albúmina de bovino (BSA 25%). Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con solución tampón fosfato 0.01 M. para eliminar todo el anticuerpo secundario unido a sitios inespecíficos.

5.3.3.3 Inmunoperoxidasa y Diaminobenzidina

Para visualizar la reacción antígeno-anticuerpo se utilizó un sistema de inmunoperoxidasa con el kit ABC (*Elite*, Vector[®]), consistente en un complejo peroxidasa que

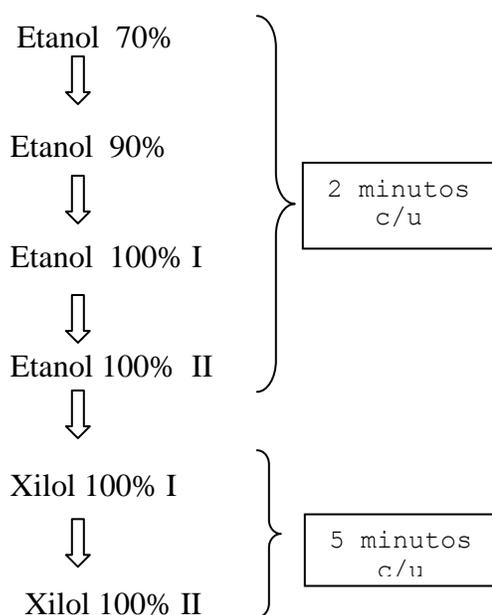
contiene avidina y un reactivo peroxidasa de rábano biotinilado (HRP), el cual se acopla al anticuerpo secundario.

Los cortes se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente y en un lugar protegido de la radiación luminosa. Luego se adicionó un sustrato colorimétrico, diaminobenzidina (DAB), en una concentración de 10% en PBS 0.01 M que contenía también un 1% de H₂O₂ (0.3%). La incubación de esta solución es variable dependiendo de la velocidad de aparición de la marca café, lo que ocurre en alrededor de 9 minutos. Una vez logrado el grado de tinción esperado, la reacción se detiene adicionando rápidamente PBS 0.01 M frío (aproximadamente a 1°C). La determinación del tiempo de incubación del DAB requirió la realización de pruebas con diferentes tiempos y concentraciones, hasta obtener la tinción más satisfactoria. Finalmente se realizan 4 lavados de 5 minutos con solución tampón fosfato (0.01 M).

El sustrato colorimétrico, 3,3' diaminobenzidina o DAB, forma un producto coloreado insoluble que precipita sobre la membrana en el lugar de acción de la enzima, actuando sobre la HRP lo que genera la aparición de un precipitado marrón.

5.3.3.4 Montaje de las muestras

Una vez terminada la inmunohistoquímica, los cortes fueron montados en portaobjetos, secados en una estufa a 37°C por alrededor de 2-3 horas, para finalmente deshidratarlos en una batería de alcoholes y xilol en concentraciones crecientes. La secuencia es la siguiente:



Terminada la deshidratación, se agrega una resina (Entellan[®]) y posteriormente el cubreobjeto para sellar la muestra.

5.3.3.5 Controles negativos

Los controles negativos consistieron en cortes a los cuales se les realizó la secuencia de incubaciones y lavados en ausencia del anticuerpo 1^o, para determinar el grado de unión inespecífica del anticuerpo secundario.

Los experimentos fueron realizados en forma paralela para ambas edades con el fin de someterlos a las mismas condiciones de manipulación y experimentación.

5.4 Hibridización *in situ*

Se pueden utilizar sondas marcadas con elementos radioactivos, pero como se necesita protección y manipulación especiales, no son de elección para su uso rutinario. Las técnicas no-isotópicas o colorimétricas son más rápidas y permiten una localización más precisa de la reacción. Las sondas marcadas sin elementos radioactivos son más estables y más baratas y la sensibilidad es igual o levemente inferior a la de los métodos isotópicos. Se utilizan comúnmente sondas marcadas con biotina y digoxigenina.

La hibridización *in situ* se realizó con una sonda de ARN obtenida mediante transcripción *in vitro*.

5.4.1 Digoxigenina

La digoxigenina que es utilizada como método de marcaje, corresponde a un esteroide proveniente de plantas digitales (*Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*). Las floraciones de esas plantas son las únicas fuentes naturales de digoxigenina, por ello el anticuerpo anti-digoxigenina no puede obtenerse desde otros materiales biológicos.

Las sondas para hibridización marcadas con DIG (digoxigenina) pueden ser detectadas con anticuerpos anti-digoxigenina (anti-Dig) de alta afinidad que son conjugados con fosfatasa alcalina, peroxidasa, fluoresceína, rodamina, amino-metilcumarin ácido acético (AMCA) u

oro coloidal. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos antidigoxigenina no conjugados y anticuerpos secundarios conjugados.

La sensibilidad de la detección depende del método utilizado para visualizar el anticuerpo antidigoxigenina conjugado. Por ejemplo, cuando un anticuerpo antidigoxigenina es conjugado con fosfatasa alcalina es visualizado con colorimetría, utilizando el complejo 5-Bromo-4-cloro-indolfosfato/nitrozultetrazolium (BCIP/NBT) para evidenciar la reacción.

5.4.2 Métodos de marcaje para ARN

En contraste con las sondas de ADN, las sondas de ARN son generadas por transcripción *in vitro* desde un templado linearizado. En este caso se utiliza un promotor para ARN polimerasa en el vector de ADN que contiene el templado. SP6, T3, o T7 ARN polimerasa son comúnmente usadas para sintetizar ARN complementario al ADN. La reacción de síntesis demora aproximadamente de 1 a 2 horas. Los transcritos sintetizados son una copia exacta de la secuencia que se encuentra desde el promotor hasta el sitio de restricción usado para la linearización. El tamaño de la sonda puede ser ajustado por la elección de las enzimas de restricción usadas para la linearización. Las sondas de ARN son de cadena única. La proporción de sonda ARN marcada no radioactivamente que se obtiene a partir de ADN es aproximadamente 10 µg de sonda a partir de 1 µg de ADN plasmidial.

5.4.3 Tratamiento ARNasa

Para preparar la sonda de ARN, todas las soluciones utilizadas se prepararon empleando agua tratada con dietilpirofosfato (DEPC), utilización de guantes, mascarilla, placas de cultivo libres de endonucleasas, tratamiento de utensilios y cuchilla del crióstato con un inhibidor de ARNasa, entre otras medidas. El tratamiento para la ARNasa remueve esta enzima que está presente en forma ubicua en la piel y que en caso de contaminar los elementos utilizados para la preparación de la sonda, puede interferir con la obtención de cantidades suficientes de ella o interferir en la realización de los experimentos.

5.4.4 Preparación de la sonda de ARNm de conexina 36

Para realizar los experimentos de hibridización *in situ* se elaboró una sonda a partir del ADNc de rata para Cx 36, inserto en el plasmidio p-Bluescript (2.96 kb), el cual fue

proporcionado por el Dr. Willecke. El ADN de la muestra se amplificó y purificó a través de minipreparaciones plasmidiales para luego ser alicuotado en 3 tubos cada uno con una minipreparación original.

5.4.4.1 Chequeo presencia inserto

En primer lugar se comprobó la presencia del inserto (1.86 kb) a través de la digestión con la enzima EcoRI , de acuerdo al mapa proporcionado por el Dr. Willecke, por un período de 2 horas a 37°C. Esta enzima reconoce la secuencia de nucleótidos G↓AATTC, que corresponde a los extremos del inserto (ADNc) en el plasmidio. Luego de la digestión se corrió un gel de agarosa 1%.

5.4.4.2 Eliminación de bases

El tamaño del inserto era muy extenso para elaborar una sonda, por lo tanto se procedió a eliminar una porción de éste. Para ello fue necesario realizar una digestión con la enzima Hind III, la cual reconoce la secuencia de nucleótidos A↓AGCTT, de las cuales hay 2, una en el extremo 5' y otra en el sitio 689 del inserto. De esta manera se eliminaron aproximadamente 0.60 kb del inserto, dejando 1.2 kb.

Para la eliminación del trozo del inserto no deseado se preparó la siguiente solución (volumen total 20 µl):

10.0 µl de minipreparación original

0.5 µl de enzima Hind III (la cual debe cortar aprox. 500 ng de ADN en 1 hora)

2.0 µl de buffer

0.2 µl de BSA 100x (albúmina de suero bovino)

7.3 µl de Agua DEPC

20 µl totales

Esta solución se incubó a 37°C por 1 hora. Posteriormente la totalidad de la muestra (20 µl) se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 1%, para separar el ADN para la sonda y su posterior aislamiento. La localización relativa de los fragmentos se determinó con bromuro de etidio, que se intercala entre la doble hélice de ADN y en presencia de luz UV

aparece brillante. La banda correspondiente al ADN plasmidial con inserto se aisló cortando un trozo del gel de agarosa.

5.4.4.3 Purificación del ADN y Ligación

Utilizando el protocolo (QIAquick[®] Spin Handbook, Julio 2002) se extrajo el ADN desde el gel de agarosa con el plasmidio-inserto. Primero se pesó el trozo de gel y se calculó el volumen necesario para extraer el DNA. Luego, mediante columnas de extracción, se purificó y concentró el ADN presente en el trozo de gel, obteniéndose una muestra de 30 μ l, de los cuales se emplearon 3 μ l para chequear la presencia del inserto en un gel de agarosa 1%.

Posteriormente se ligó el plasmidio-inserto para su circularización con 1 μ l de la muestra y 1 μ l de la enzima T₄ ADN ligasa, además de agua DEPC y buffer, logrando un volumen final de 10 μ l. Esta mezcla de ligación se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente y luego se detuvo la reacción con hielo.

5.4.4.4 Transformación

La amplificación del ADN plasmidial se realizó con la bacteria *Escherichia coli*, cepa JM 109. Se mezclaron 20 μ l de cultivo con 2 μ l de mezcla de ligación y como medios de cultivo XGal en una cantidad de 25 μ l e IPTG 50 μ l. Se incubaron a 37°C por 1 ½ hora en agitación a 250 r.p.m. Luego de la centrifugación, se separó el sobrenadante el cual fue sembrado en placas LB/Ampicilina y se incubaron en estufa a 37°C toda la noche.

Se seleccionaron las placas que presentaron colonias en presencia del antibiótico. Algunas colonias aisladas fueron traspasadas a tubos de ensayo con 10 ml de LB/Ampicilina, los cuales se dejaron en cultivo en estufa a 37° C toda la noche. El crecimiento bacterial, fue constatado por el contenido opalescente de los tubos. Las bacterias fueron aisladas mediante centrifugación a 6.000 r.p.m por 3 minutos.

5.4.4.5 Minipreparación plasmidial y purificación

Luego siguiendo el protocolo (QIAprep[®] Miniprep Handbook, Noviembre 2003) se aisló el ADN del cultivo bacteriano. De este proceso se obtuvieron 12 minipreparaciones de 30 μ l cada una. El resultado de las minipreparaciones fue visualizado mediante un gel de agarosa 1 %, utilizando 2 μ l de cada preparación. Se escogió una de las minipreparaciones

que contenía bastante ADN para elaborar la sonda; tomando un volumen de 10 µl tanto para la sonda sentido como para la antisentido. Las muestras se linearizaron utilizando las enzimas EcoRI en el caso de la sonda sentido y KpnI para la antisentido, reacción que se desarrolló por toda la noche a 37°C.

La linearización fue constatada mediante un gel de agarosa 1% utilizando 6 µl de cada muestra. En el caso de la sonda antisentido, algunas bandas extras aparecieron bajo el inserto por lo cual para evitar efectos de contaminación, se purificó el trozo del inserto desde el gel de agarosa utilizando un protocolo estándar (QIAquick® Spin Handbook, Julio 2002).

Posteriormente, a cada sonda se le agregó SDS 10% (Dodecil sulfato de Sodio) y Proteinasa K, se dejaron en baño a 50°C por 30 minutos. Luego se les agregó acetato de sodio y fenol: cloroformo, se agitaron y centrifugaron. Se extrajo la fase acuosa y se les agregó cloroformo. Desde aquí en adelante se desarrolló el trabajo libre de ARNasa, por lo tanto se debieron tomar las medidas correspondientes.

Nuevamente luego de agitar, se extrajo la fase acuosa y se le agregó etanol 100% y acetato de amonio 3 M, dejándolo toda la noche a -20°C. A continuación, se centrifugaron las muestras por 30 minutos, a 4°C y 15.000 r.p.m. Se extrajo el etanol 100% y se colocó etanol 75% a 4°C. Nuevamente se centrifugaron las muestras en las mismas condiciones anteriores, se extrajo el etanol y se dejó secar el pelet. Una vez seco, se resuspendió en 10 µl de agua tratada con dietilpirofosfato (DEPC).

5.4.4.6 Cuantificación del ADN

Se cuantificó el ADN linearizado en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm (UV). Para la lectura se utilizaron 2 µl de la muestra correspondiente a cada sonda los cuales se diluyeron en 498 µl de agua DEPC, por lo tanto la dilución es 250.

La cantidad de ADN se calculó utilizando la siguiente formula:

Cantidad ADN (µg/ml): D.O. x 50 (µg/ml) x factor de dilución

5.4.4.7 Transcripción

Para realizar la transcripción de las sondas sentido y antisentido se utilizaron las enzimas T₇ y T₃ ARN polimerasa respectivamente, a partir de ADN linearizado. Los elementos se mezclaron en el siguiente orden y cantidad:

Eco RI (sentido) KpnI (antisentido)

ADN lineal	1	4
Digoxig/NTP mix	2	2
Buffer Transcrip. 5x	4	4
Agua DEPC	10	7
Inhibidor ARNasa	1	1
T ₃ ARN polimerasa	----	2
T ₇ ARN polimerasa	2	----
Volumen Total	20 µl	20 µl

La mezcla de nucleótidos incluye ATP, UTP, GTP, CTP y UTP marcado con digoxigenina. Esta reacción se incubó por 2 horas a 37°C. Luego, se agregaron 20 unidades de ADNsa y se incubó por 15 minutos a 37°C, para remover el templado de ADN. Finalmente se sometió a un baño de 65°C para detener la reacción.

Posteriormente se corrió un gel de agarosa 1% utilizando 1 ul de la reacción de transcripción para chequear el resultado de ésta. Los resultados de este proceso fueron negativos por lo cual se decidió otra estrategia de linearización.

Se emplearon 2 enzimas para la elaboración de la sonda antisentido y manteniendo la enzima EcoRI para la sonda sentido, se realizó una nueva linearización. El resultado de este proceso permitió descartar el uso de la enzima Apa I, escogiendo para seguir el proceso la Hind III. Se prosiguió con todos los procedimientos ya descritos, pero no hubo resultado en la obtención de la sonda, probablemente porque el volumen inicial de la minipreparación era insuficiente, por ello se realizó una nueva linearización pero esta vez contando con un mayor volumen de muestra, 35 µl.

Sonda Sentido

Agua bidestilada	52
Buffer 10x	10
BSA 100x	1
Muestra	35
Enzima EcoRI	2
Volumen total	100 μ l

Sonda Antisentido

Agua bidestilada	52
Buffer 10x	10
BSA 100x	1
Muestra	35
Enzima Hind III	2
Volumen total	100 μ l

Esta reacción se dejó 3 horas a 37°C. Se chequeó el resultado a través de un gel de agarosa 1%, para lo cual se emplearon 5 μ l del volumen total.

Luego se le agregó 5 μ l SDS 10% (Dodecil sulfato de Sodio) y 0.6 μ l de Proteinasa K (25mg/ml), se incubó en baño a 50°C por 30 minutos. Posteriormente se agregó 11 μ l de acetato de sodio junto con 100 μ l de fenol:cloroformo, se agitó y centrifugó. Se extrajo la fase acuosa y se agregó 100 μ l de cloroformo. Desde aquí en adelante se desarrolló el trabajo libre de ARNasa. Se extrajo la fase acuosa (alrededor de 85 μ l) y se le agregó 250 μ l de etanol 100% libre de ARNasa y acetato de amonio 3M, dejándolo toda la noche a -20°C.

Luego se centrifugó por 30 minutos, a 4°C y 15.000 r.p.m. Se extrajo el etanol 100% y se colocó etanol 75% a 4°C. Nuevamente se centrifugaron las muestras en las mismas condiciones anteriores, se extrajo el etanol y se dejó secar el pelet por 2 horas a temperatura ambiente. Una vez seco, se resuspendió en 20 μ l de agua DEPC. Se corrió un gel de agarosa 1% para ver el resultado utilizando 1 μ l del volumen final. Se midió la cantidad de ADN de acuerdo a la fórmula ya descrita.

Para realizar la transcripción, se utilizaron 15 μ l de ADN linearizado para llegar a un volumen total de 20 μ l. Esta incubación se dejó 2 horas a 37°C. Posteriormente se adicionó 1 μ l de ADNsa, y se dejó en estufa a 37°C por 1 hora.

5.4.4.8 Precipitación de ARN

A los 19 μ l restantes de la transcripción de cada sonda, se les agregó 30 μ l de agua DEPC, 5 μ l de acetato de amonio y 150 μ l de etanol 100%. Se dejó incubando toda la noche a -20°C .

Posteriormente las muestras fueron centrifugadas 25 minutos, a 4°C y 15.000 r.p.m.. Se extrajo el sobrenadante y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se resuspendió en 20 μ l de agua DEPC. Para ver los resultados, se utilizó 1 μ l de cada reacción en un gel de agarosa.

5.4.4.9 Medición de ARN

Se utilizaron 2 μ l de cada muestra para realizar esta medición, por lo que el volumen final de cada sonda es de 17 μ l. La medición del ARN se hace empleando el mismo método de lectura para ADN (paso 5.4.5.2) y luego se hace la conversión a través de la siguiente fórmula:

- Cantidad de ARN: $\text{O.D} \times 40 \times \text{Factor de dilución}$

5.4.5 Aplicación de la sonda en los tejidos

5.4.5.1 Prehibridización

Se obtuvieron cortes de 25 μm de grosor y se depositaron en pocillos en un número aproximado de 6-8. Para realizar la prehibridización fue necesario elaborar un stock de la solución, la cual se alicuotó y congeló. El stock es el siguiente:

50 ml de solución:

10 ml de Citrato de sodio salino (SSC) 20X

39 ml de agua DEPC

1 ml de Denhart 50X

A cada alícuota se le adicionaba 50 µl de esperma de salmón (1mg/ml) por cada 1 ml de solución. Se dejó incubando a 50°C por 90 minutos en un agitador orbital. Esta incubación de prehibridización es necesaria para prevenir el marcaje inespecífico.

5.4.5.2 Hibridización

La sonda fue denaturada inmediatamente antes del término del paso de prehibridización, mediante una incubación a 90°C por 5 minutos y luego un paso rápido a hielo.

Luego los cortes de tejido se incubaron en la siguiente solución:

- Buffer 5X	200	µl
- Formamida 50%	500	µl
- Ditioneitol (DTT) 1M	1	µl
- ADN esperma salmón (1mg/ml)	50	µl
- Agua DEPC	246.5	µl
- Sonda ARNm Digox	2.5	µl (si la concentración de la es 1 µg/ml)

Para determinar la concentración de sonda óptima para desarrollar los experimentos, se probaron 3 concentraciones de sonda: 1 µg/ml correspondiente a la dilución 10x, 0.1 µg/ml, es decir 1x y 100 veces más diluida, 0.01 µg/ml (-10x). Estas pruebas permitieron determinar que las mejores tinciones se obtenían con las concentraciones 1x y -10x.

En todos los experimentos se usó como control negativo muestras sin sonda, a las cuales se les daba el mismo tratamiento que a las otras, con la excepción de excluir la sonda en el proceso de hibridización.

Luego se realizaron 6 lavados de 10 minutos cada uno, a temperatura ambiente, con agua DEPC y citrato de sodio salino (SSC 20X) en concentraciones decrecientes. Estos lavados se realizan con el objeto de separar posibles hibridizaciones de la sonda a secuencias no específicas, parcialmente homólogas a su propia secuencia, que tendrían como resultado falsos positivos.

5.4.5.3 Bloqueo y permeabilización.

Previo a la utilización del anticuerpo, fue necesario permeabilizar el tejido con el objeto de permitir el ingreso de la sonda a la célula. Las muestras se incubaron en una solución tampón que contenía 10% de Tris (1M pH 7.5), 7.5% de NaCl 2M, 0.1 % de detergente Triton® X-100, 1% de albúmina de suero bovino (BSA) y un 81.4% de agua DEPC. Este procedimiento se efectuó por 30 minutos, a temperatura ambiente, en agitador orbital.

5.4.5.4 Inmunohistoquímica

Se utilizó el anticuerpo antidigoxigenina-AP (N° Cat. 11093274910, Roche®) en una concentración de 1/500, en la misma solución de bloqueo utilizada en el paso anterior. La incubación se desarrolló por 2 horas, a temperatura ambiente. Este procedimiento se realizó también con los controles negativos en muestras en que se omitió la incubación con la sonda.

5.4.5.5 Revelado

Para el revelado de las muestras se utilizó una solución tampón TC la cual incluía para 1 ml de solución: 80% de agua DEPC, 10% de Tris (pH 9.5), 5% de MgCl₂ 1M y 5% de NaCl 2M. A esta solución base se agregaba la sustancia de revelado; 5-Bromo-4-cloro-indolfosfato/nitrozultetrazolium (BCIP/NBT N° Cat. 1681451, Roche®). Para 5 ml de solución de revelado, se agregaban 90 µl del complejo BCIP/NBT, es decir, correspondía al 1.8% del volumen final.

La incubación se realizó en ambiente protegido de la luz por 45 minutos. Para llegar a determinar este tiempo de acción, fue necesario realizar pruebas previas con distintos tiempos y concentraciones.

Se realizaron 2 lavados de 10 minutos cada uno, con solución fosfato salina 0.01 M

5.4.5.6 Montaje de las muestras

Los cortes se dejaron secar en portaobjetos y se deshidrataron en una batería alcohólica en la siguiente secuencia:

Etanol 70%	1 minuto
Etanol 95%	1 minuto
Etanol 100% I	1 minuto
Etanol 100% II	2 minutos
Xilol I	3 minutos
Xilol II	5 minutos

Luego se cubren las muestras con la resina Entellan[®] y se sellan con el cubreobjeto.

5.5 Visualización y cuantificación Anticuerpo anti Conexina 36

La medición de la presencia de la proteína Cx 36 se realizó en 3 ratas de 14 días y 3 de 2 meses, experimentos que se llevaron a cabo en paralelo. Dentro de cada experimento se midió la proteína tanto en cortes de BO como de OI, considerando cortes a los cuales se les aplicó anticuerpo primario y cortes a los que se les omitió este paso. Para tal efecto, se trabajó con aproximadamente 6-8 cortes de cada tipo de tejido (BO u OI) por pocillo, para cada edad y tratamiento, es decir, incubación con anticuerpo primario u omisión de este paso.

Al término del procedimiento experimental, los cortes fueron montados en portaobjetos clasificados según edad, tipo de tejido y tratamiento aplicado. Para determinar cuantitativamente si existía diferencia en el patrón de expresión de la proteína conexina 36 en las diferentes capas dentro de cada corte, se obtuvieron fotografías de los cortes de BO y de OI bajo microscopía de luz, utilizando una cámara Nikon[®] Coolpix 5000. Todas las fotografías obtenidas fueron tomadas empleando un objetivo de microscopio 40x, considerando 3 fotografías sucesivas para ambos tipos de tejidos para incluir la totalidad de la zona de interés. Luego las fotografías fueron traspasadas a formato JPG.

Posteriormente utilizando el programa ImageJ (NIH Image) se cuantificó la diferencia en la expresión de la proteína conexina 36 entre las diferentes capas del bulbo olfatorio (nervio olfatorio, glomerular, plexiforme externa y granular) para cada edad y en el control positivo, la oliva inferior realizando el procedimiento descrito a continuación. Primero se transformaron las fotografías desde el modelo de color RGB (rojo, verde, azul) al formato en escala de grises que produce una inversión de la intensidad de tinción, de manera que las zonas con mayor

tinción DAB aparecen con menor intensidad o más oscuras y las con menor marca aparecen más luminosas. Luego se definió un área dentro de cada capa donde se realizará la cuantificación, esto es en el caso de todas las capas excepto la capa glomerular, abarcar la mayor extensión de tejido posible. En el caso de la capa glomerular debido a que no tiene una forma regular se analizaron 3 a 4 glomérulos por corte.

Un ejemplo de la definición de áreas cuantificadas se muestra en la figura 1A, B, C.

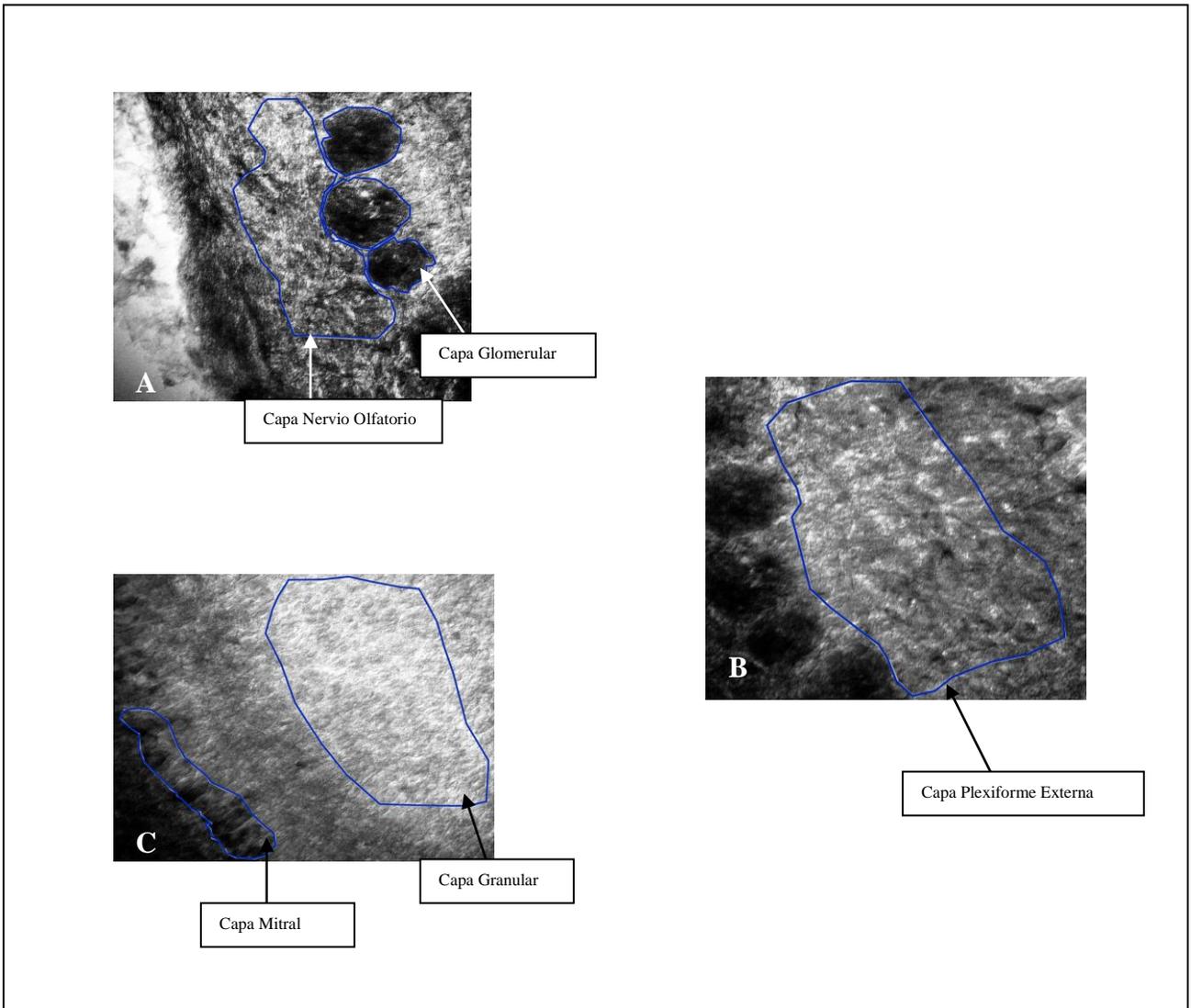


Figura 1. Ejemplo de las áreas definidas para la cuantificación y comparación de la intensidad de la tinción con DAB entre las distintas capas del BO. **A.** Áreas utilizadas para la medición de capas Nervio Olfatorio y Glomerular. **B.** Área utilizada para la medición de la capa

Plexiforme Externa. C. Área utilizada para la medición de la capa Granular.

5.6 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos con el programa Image J corresponden a un promedio de la intensidad de todos los píxeles de la muestra en un área determinada. Este valor podría tener variaciones debido a diferencias en la iluminación del microscopio durante la sesión de fotografías como también debido al desarrollo de la reacción de tinción con DAB. Para disminuir la variación debido a la iluminación de los cortes se tomaron las fotos con las mismas condiciones de intensidad de iluminación, posición del condensador y apertura del diafragma, como también utilizando similares parámetros en la cámara fotográfica. Por otra parte, la tinción con DAB utilizada para visualizar el grado de unión del anticuerpo primario al tejido puede resultar en un grado variable de coloración debido al tiempo que permanece la reacción. Para disminuir las variaciones debidas a esta técnica, los datos obtenidos fueron normalizados con respecto a la capa de tejido que posee el menor grado de tinción. Se utilizó como referencia el promedio correspondiente a la capa granular, capa que presentó menor grado de marca con DAB en todos los experimentos realizados. Para la normalización, el promedio de cada capa de un corte se dividió por el promedio de la capa granular del mismo corte.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el software estadístico Statmost (Dataxiom Software Inc.). Para determinar si las diferencias observadas entre las distintas capas son estadísticamente significativas se realizó un test ANOVA de 1 vía para todas las capas y edades, considerando como resultados significativos aquellos con un $p < 0.001$. Para establecer diferencias significativas entre capas se utilizó el test Post-hoc de Student-Newmann-Keuls.

Debido a que el tamaño de la muestra es pequeño ($n=6$) y además todos los animales fueron obtenidos desde el bioterio de la Facultad de Medicina, donde se encuentran en condiciones ambientales y de manejo controladas, no se incluyó en el análisis estadístico el efecto rata.

6 RESULTADOS

6.1 Presencia de la proteína Conexina 36 en las capas del bulbo olfatorio

La determinación de la presencia de la proteína conexina 36 en las distintas capas del BO requirió el ensayo de varios protocolos. En un principio utilicé la técnica de inmunohistoquímica en cortes previamente montados en un portaobjetos, con un anticuerpo monoclonal anticonexina 35/36 producido en ratón (Chemicon[®], N° Catálogo MAB3045). Los resultados obtenidos fueron negativos, es decir no hubo marca positiva en BO ni en aquellos controles positivos en el rafe, tal como se muestra en las figuras 2A, B, C y D. En la Figura 2 tanto en el BO como en la oliva inferior (A, B, D) no se observa una marca específica en particular cuando se compara la tinción en ausencia de anticuerpo primario (C).

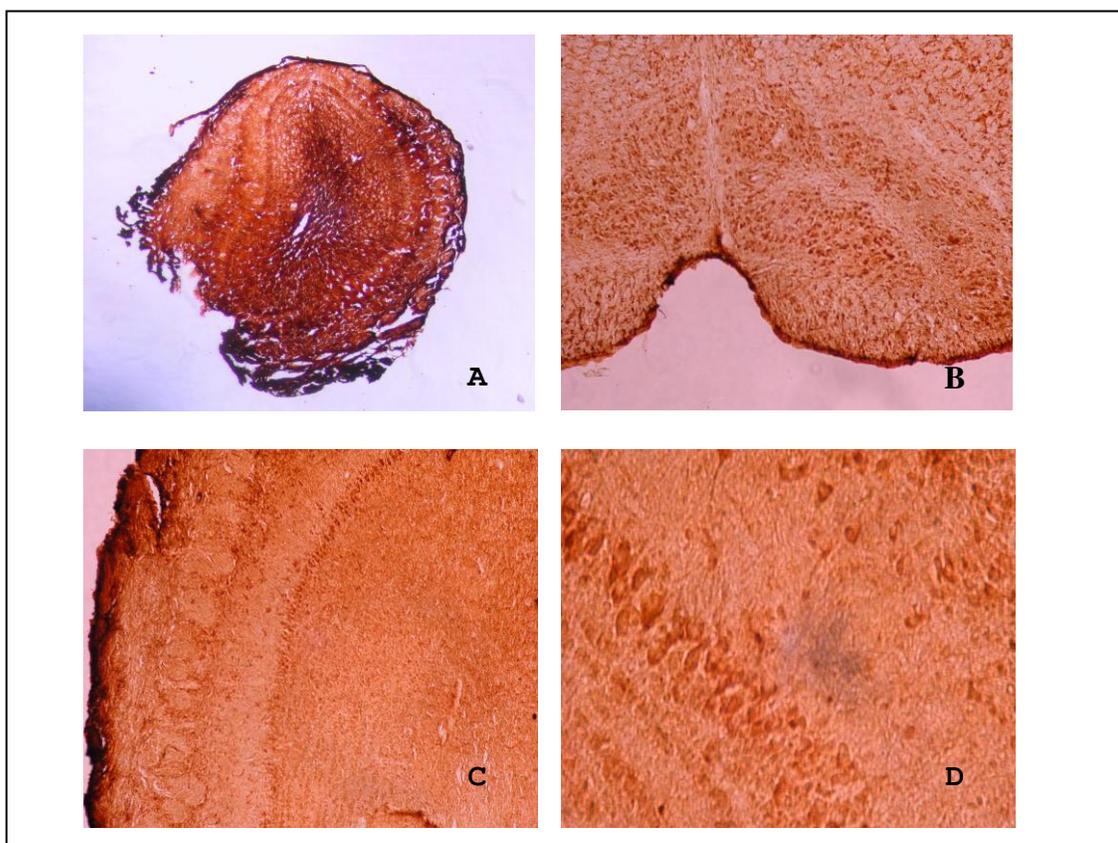


Figura 2: Microfotografías de cortes de BO (A, C y D) y Oliva Inferior (B). **A.** Bulbo olfatorio de 2 meses, anticuerpo monoclonal 1:50, 4x. **B.** Oliva inferior de 2 meses, anticuerpo monoclonal 1:50, 4x. **C.** BO de 14 días, sin anticuerpo primario. 4x. **D.** BO, capa mitral de 2 meses. Anticuerpo monoclonal 1:50, 10x.

Debido a estos resultados negativos, desarrollamos la técnica de inmunohistoquímica flotante, pero esta vez con un anticuerpo primario diferente cuya especificidad para conexina 36 ya se había probado en otros tejidos (Condorelli et al., 1998; Srinivas et al., 1999). El anticuerpo utilizado fue el de tipo policlonal anticonexina 36 producido en conejo (Zymed[®] N° catálogo 51-6200) con el cual obtuve una tinción mucho más específica, claramente diferenciada con los controles sin anticuerpo primario (Figura 3B) donde la marca aparecía sólo en aquellos tejidos tratados con el anticuerpo primario (Figura 3A, C). Más aún, en la inmunohistoquímica en cortes flotantes la integridad del tejido mejoró sustancialmente complementando los resultados con el anticuerpo primario. Estas diferencias se pueden apreciar en las Figura 3A y C.

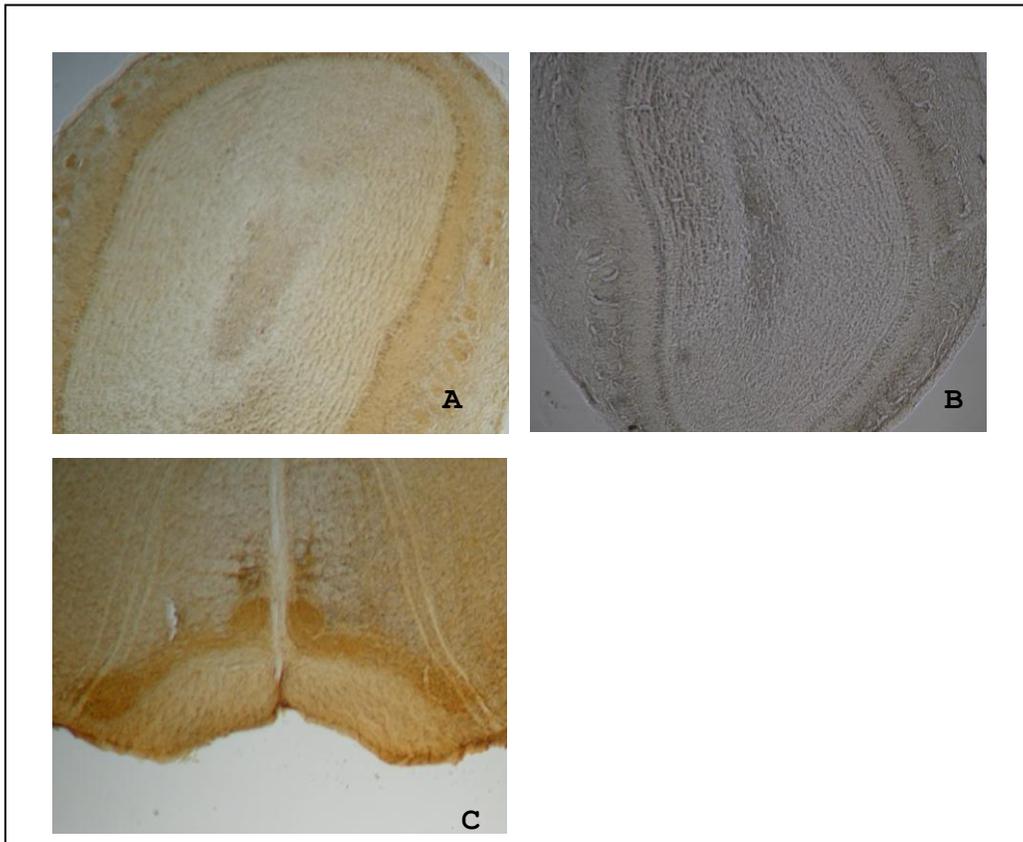


Figura 3: A. Microfotografía de BO 14 días de edad. Anticuerpo policlonal 1:100, 4x. B. Corte de BO de 14 días, sin anticuerpo primario, 4x. C. Corte de OI de 2 meses de edad. Anticuerpo policlonal 1:100, 4x.

6.1.1 Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos consistió en primer lugar en una normalización de ellos para así poder lograr valores posibles de comparar entre diferentes cortes, dado que el proceso de obtención de las fotografías puede haber introducido diferencias absolutas en el grado de tinción. Para la normalización, se dividió el promedio obtenido de cada capa dentro del corte por el promedio de la capa con el menor grado de tinción específica dentro del mismo corte. La capa utilizada como base para la normalización fue la capa granular la cual presentó el menor grado de tinción en todos los cortes.

6.1.1.1 Animales de 14 días

Los datos obtenidos en los cortes de BO en las distintas capas de esta estructura se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Diferencias en la expresión de la conexina 36 en las distintas capas del BO de animales de 14 día determinadas utilizando Análisis de Varianza.

Capa	n	Promedio	Desviación Estándar	Error Estándar
Nervio Olfatorio	6	0.2441	0.1847	0.0754
Glomerular	6	0.6710	0.2113	0.0863
Plexiforme Externa	6	0.4057	0.1698	0.0693
Granular	6	0.0000	0.0000	0.0000

Fuente de Variación	gl Grados de Libertad	SC Suma de Cuadrados	CM Cuadrados Medios	F	P
Entre capas	3	1.4299	0.4766	17.7216	7.471x10 ⁻⁶
Dentro de capas	20	0.5379	0.0269		
Total	23	1.9678			

Los resultados del análisis de varianza de una vía (ANOVA) que se muestran en la tabla 1, indican que existen diferencias significativas entre las capas analizadas ($p < 0.001$). Luego para determinar cuales capas contribuyen a estas diferencias, se realizó el test *post hoc* Newman-Keuls, resultados que se muestran en la tabla 2. De este análisis se desprende que existen diferencias significativas al comparar las capas Nervio Olfatorio (NO) y Glomerular (Gl); NO y Granular (Gr), Gl y Plexiforme externa (PE) ; Gl y Gr y entre PE y Gr. La única excepción en que no existe diferencia significativa es la comparación entre las capas NO y PE.

Tabla 2. Resumen de las diferencias observadas en la expresión de Cx 36 en las diferentes capas del BO de ratas de 14 días. La diferencias entre capas se determinaron utilizando el test de Newman-Keuls.

Significancia	Capas comparadas	Diferencia Promedios
SI	NO Vs. Gl	-0.4269
NO	NO Vs. PE	-0.1616
SI	NO Vs. Gr	0.2441
SI	Gl Vs. PE	0.2653
SI	Gl Vs. Gr	0.671
SI	PE Vs. Gr	0.4057

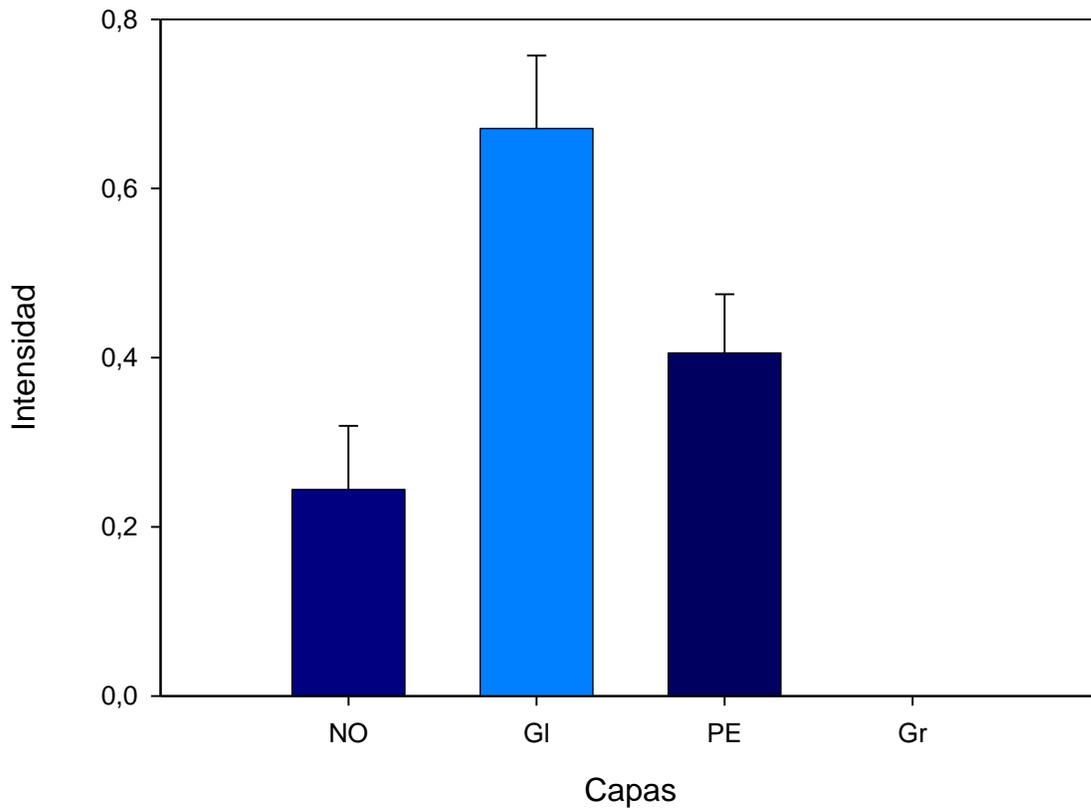


Figura 4. Comparación de la intensidad de la marca promedio en las diferentes capas del BO de animales de 14 días. Los valores corresponden al promedio de las mediciones realizadas en 2 cortes de un total de 3 experimentos seleccionados (6 datos totales). La barra de error corresponde al error estándar.

6.1.1.2 Animales de 2 meses

Los datos obtenidos en los cortes de BO en las distintas capas de esta estructura se muestran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Diferencias en la expresión de la conexina 36 en las distintas capas del BO de animales de 2 meses, determinadas utilizando Análisis de Varianza.

Capa	n	Promedio	Desviación Estándar	Error Estándar
Nervio Olfatorio	6	-0.0826	0.4327	0.1766
Glomerular	6	0.5467	0.2470	0.1008
Plexiforme Externa	6	0.3783	0.2652	0.1083
Granular	6	0.0000	0.0000	0.0000

Fuente de Variación	gl Grados de Libertad	SC Suma de Cuadrados	CM Cuadrados Medios	F	P
Entre capas	3	1.6285	0.5428	6.8154	0.0024
Dentro de capas	20	1.5929	0.0796		
Total	23	3.2214			

Los resultados del análisis de varianza de una vía (ANOVA) que se muestran en la tabla 3, indican que existen diferencias significativas entre las capas analizadas ($p < 0.001$). Posteriormente para determinar cuales capas contribuyen a estas diferencias, se realizó el test *post-hoc* Newman-Keuls, resultados que se muestran en la tabla 4. Este análisis refleja que existen diferencias significativas entre las capas NO y Gl; NO y PE; Gl y Gr y entre PE y Gr. No existen diferencias significativas entre las capas NO y Gr ni entre Gl y PE.

Tabla 4. Resumen de las diferencias observadas en la expresión de Cx 36 en las diferentes capas del BO de ratas de 2 meses. La diferencias entre capas se determinaron utilizando el test de Newman-Keuls.

Significancia	Capas comparadas	Diferencia Promedios
SI	NO Vs. GI	-0.6297
SI	NO Vs. PE	-0.4609
NO	NO Vs. Gr	-0.0826
NO	GI Vs. PE	0.6293
SI	GI Vs. Gr	0.5467
SI	PE Vs. Gr	0.3783

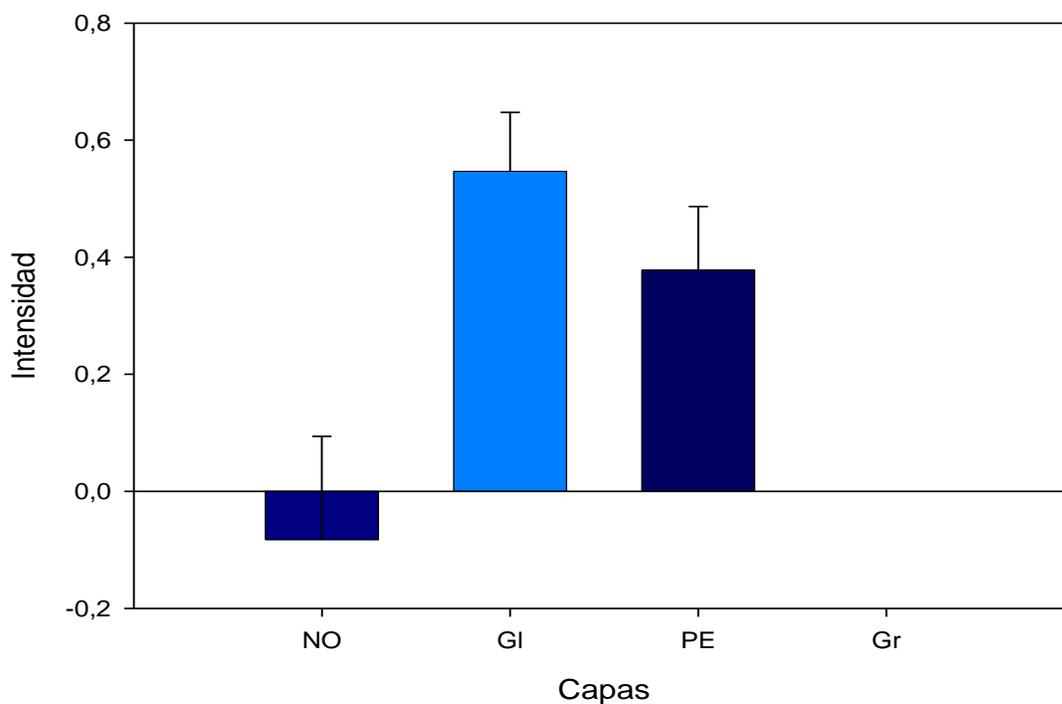


Figura 5. Comparación de la intensidad de la marca promedio en las diferentes capas del BO de animales de 2 meses. Los valores corresponden al promedio de las mediciones realizadas en 2 cortes de un total de 3 experimentos seleccionados (6 datos totales). La barra de error corresponde al error estándar.

6.2 Hibridación *in situ*

6.2.1 Resultados de la preparación de la sonda

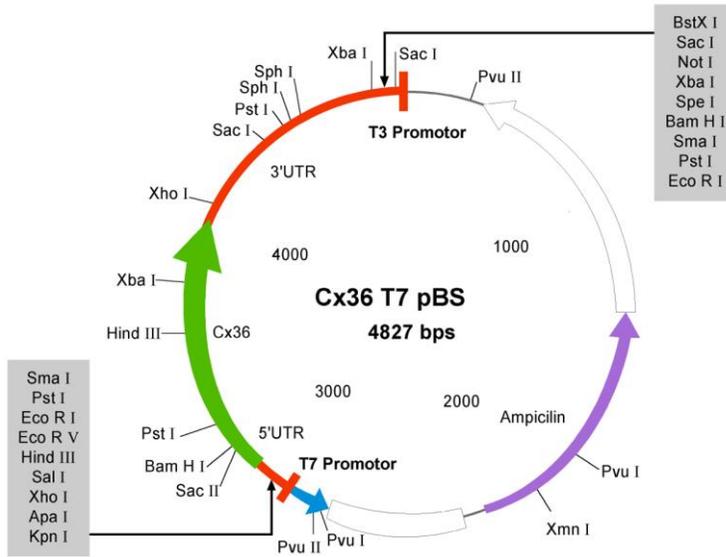


Figura 6. Plásmido p BlueScript con el inserto de conexina 36.

6.2.1.1 Verificación del inserto

Luego de la digestión con la enzima **EcoRI**, se corrió un gel de agarosa 1%, empleando como estándar de peso molecular para ADN **1 Kb Plus DNA Ladder** (12000 bp), tal como se aprecia en la **Figura 7**.

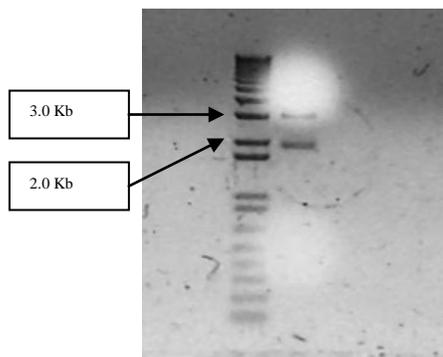


Figura 7. Gel comprobación de inserto Cx 36

6.2.1.2 Acortamiento de DNA del inserto

Para eliminar aproximadamente 600 pares de bases se realizó una digestión con la enzima Hind III y luego la totalidad de la muestra fue sometida a electroforesis en gel de agarosa 1% para extraer el trozo de gel con el tamaño adecuado de bases. Los resultados de esta etapa se muestran en la Figura 8.

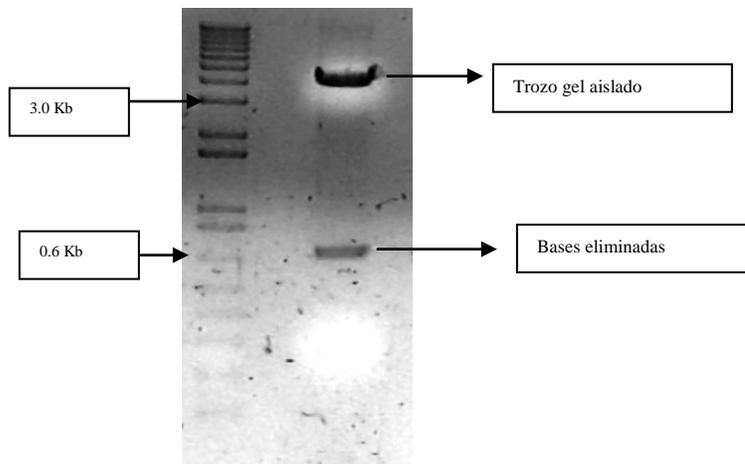


Figura 8. Gel verificación de eliminación de bases

6.2.1.3 Purificación de inserto y Minipreparación plasmidial

Siguiendo un protocolo (QIAquick[®] Spin Handbook) fue extraído el ADN desde el gel de agarosa para su purificación. Este procedimiento fue chequeado mediante un gel de agarosa 1% (Figura 9).

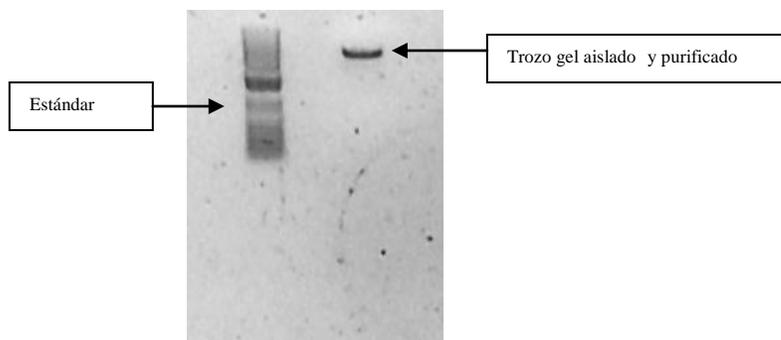


Figura 9. Gel purificación de ADN

Luego del proceso de transformación con la bacteria *Escherichia coli*, cepa JM 109 y su posterior sembrado en placa, se procedió a la obtención del ADN para sintetizar las sondas utilizando un protocolo (QIAprep[®] Miniprep Handbook). De este procedimiento se obtuvieron 12 minipreparaciones plasmidiales, las cuales fueron verificadas a través de un gel de agarosa 1% (figura 10).

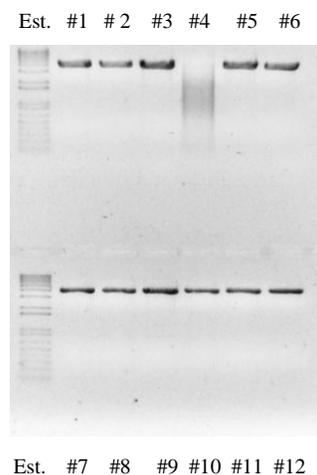


Figura 10. Gel verificación de minipreparaciones plasmidiales

6.2.1.4 Linearización de las muestras

Tras escoger una de las minipreparaciones ya chequeadas, se procedió a la linearización de la muestra la cual se dividió en dos partes; para la sonda sentido se utilizó la enzima EcoRI y para la antisentido la enzima KpnI. Para constatar el resultado de este procedimiento se corrió un gel de agarosa 1 % (figura 11).

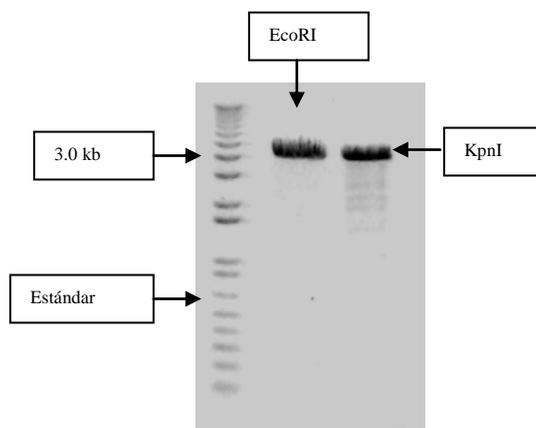


Figura 11. Gel verificación de linearización de sondas.

6.2.1.5 Purificación de sonda antisentido

Como se aprecia en la figura 11, la linearización con la enzima KpnI presentó bandas bajo el inserto, por ello fue necesario purificar el trozo del inserto utilizando un protocolo (QIAquick[®] Spin Handbook). Se corrió un gel de agarosa 1% en el cual se empleó la totalidad de la muestra (figura 12), desde el cual se extrajo el trozo de gel y se purificó. Luego de este procedimiento se chequeó el resultado a través de un gel de agarosa 1% (figura 13).

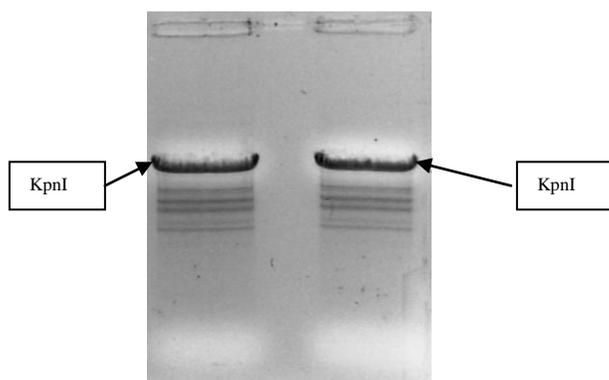


Figura 12. Gel extracción de inserto.

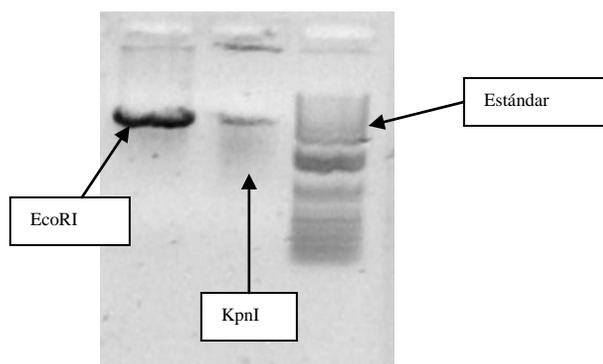


Figura 13. Gel pos purificación de bandas bajo inserto.

Posterior a esto se realizó la transcripción y el chequeo de la sonda mediante un gel de agarosa 1% (figura 14), pero el resultado fue insatisfactorio.

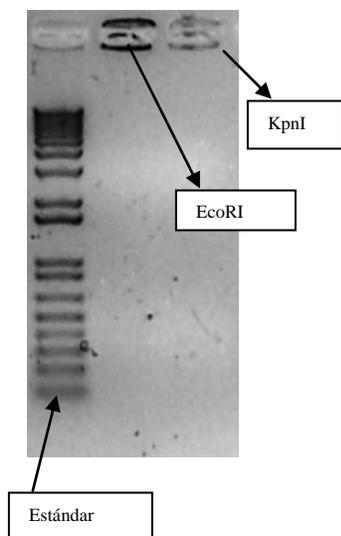


Figura 14. Gel resultado de elaboración de las sondas .

Dado lo anterior, se utilizó otra enzima de restricción para realizar la linearización de la sonda antisentido, reemplazando KpnI por Hind III. La digestión de la muestra con esta enzima fue satisfactoria, tal como se aprecia en la figura 15.

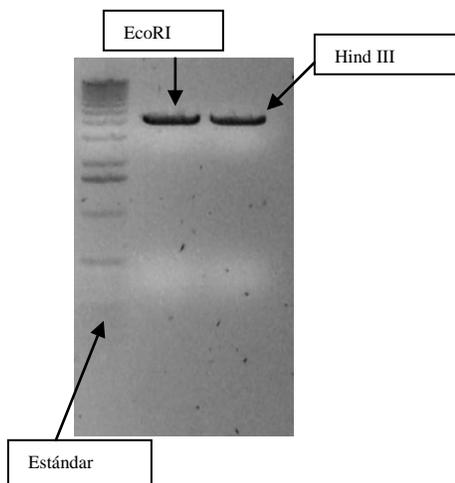


Figura 15. Gel pos linearización con enzimas EcoRI e Hind III.

A continuación se desarrolló la etapa de purificación del ADN mediante lavados con fenol:cloroformo y posteriormente precipitándolo con etanol. Esta etapa fue chequeada con un gel de agarosa (figura 16).

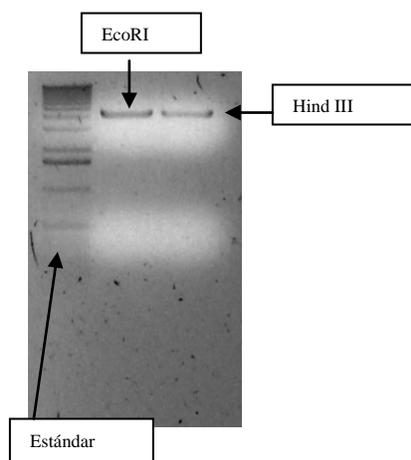


Figura 16. Gel pos fenol.

6.2.1.6 Cuantificación del ADN

Previo al proceso de transcripción, se realizó la medición de la cantidad de ADN en las muestras:

$$\text{Cantidad ADN } (\mu\text{g/ml}): \quad D.O. \times 50 (\mu\text{g/ml}) \times \text{factor de dilución}$$

$$\text{Sonda Sentido (EcoRI):} \quad 0.008 \times 50 \times 250 = \mathbf{100 \mu\text{g/ml}}$$

$$\text{Sonda Antisentido (Hind III)} \quad 0.005 \times 50 \times 250 = \mathbf{62.5 \mu\text{g/ml}}$$

6.2.1.7 Transcripción y precipitación del ARN.

Luego de realizar la transcripción, se precipitó el ARN y luego se resuspendió la sonda. Para verificar el resultado se corrió un gel de agarosa 1% (figura 17).

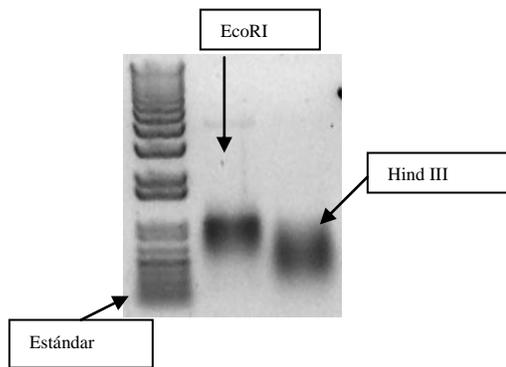


Figura 17. Gel pos resuspensión.

6.2.1.8 Cuantificación de ARN

Se emplea el mismo método de cuantificación usado para medir ADN y luego se hace la conversión con la siguiente fórmula.

$$\text{Cantidad ARN } (\mu\text{g/ml}): \quad D.O. \times 40 (\mu\text{g/ml}) \times \text{factor de dilución}$$

$$\text{Sonda Sentido (EcoRI):} \quad 0.016 \times 40 \times 250 = \mathbf{160 \mu\text{g/ml}}$$

$$\text{Sonda Antisentido (Hind III)} \quad 0.012 \times 40 \times 250 = \mathbf{120 \mu\text{g/ml}}$$

6.2.2 Presencia de ARNm en las capas del Bulbo Olfatorio

Esta técnica presentó varias dificultades. En primer lugar, la elaboración de la sonda requirió repetir varias veces pasos como la linearización y transcripción, puesto que la cantidad de sonda al final del proceso era insuficiente para desarrollar adecuadamente los experimentos.

Posteriormente al aplicar la sonda a los tejidos, tuvimos la dificultad que éstos se pegaban de tal forma que era imposible individualizarlos, tal como se aprecia en la Figura 18.

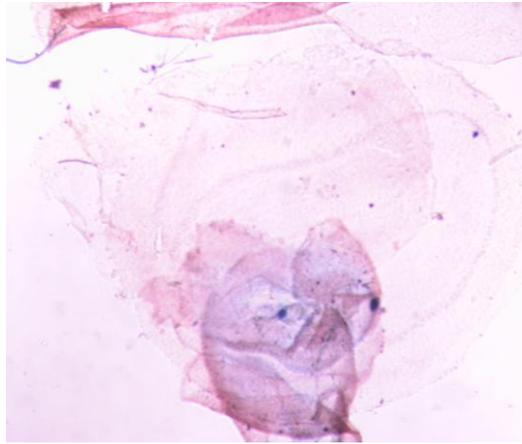


Figura 18. Hibridización *in situ*, animal 14 días

Para solucionar esto, se corrigió el proceso de fijación de las muestras mediante un aumento tanto en el volumen del líquido fijador en el proceso de perfusión como el tiempo de permanencia de los tejidos pos perfusión en él. Esta corrección permitió mejorar la integridad e individualidad de los cortes, pero la marca lograda en los tejidos era altamente inespecífica dado que en aquellos en los cuales se omitió el paso de aplicación de la sonda se visualizaba el mismo tipo de marca que en aquellos cortes en donde si se realizó ese paso.

Se intentaron varias modificaciones para obtener una marca más específica, pero ninguna de ellas permitió obtener un resultado positivo.

7 DISCUSIÓN

Uno de los problemas más interesantes y elusivos de la fisiología sensorial olfatoria es el mecanismo por el cual los organismos identifican y discriminan una variedad enorme de objetos odoríferos. A nivel del bulbo olfatorio, se ha propuesto que uno de los mecanismos de la red neuronal consiste en la generación de patrones espacio-temporales de descarga celular. El componente espacial de estos patrones depende de la activación combinatoria de los distintos glomérulos y el componente temporal depende aparentemente de oscilaciones en el potencial de campo local (LFP) (Laurent, 1999). El mecanismo de generación de las oscilaciones del LFP aun no ha sido determinado en el BO. En la corteza cerebral se ha mostrado que la presencia de uniones en hendidura mediadas por conexina 36 son fundamentales para la generación de oscilaciones del LFP en esta región del sistema nervioso central (Galarreta y Hestrin, 2001).

En base a esta evidencia, se propuso estudiar la presencia de la conexina 36, su patrón de expresión y la distribución y niveles relativos de su proteína, en las distintas capas del bulbo olfatorio de la rata con el objeto de contribuir al entendimiento de los mecanismos que nos permiten lograr la discriminación de los diferentes odorantes presentes en el ambiente. La presencia de las proteínas conexinas contribuiría en este proceso de sincronización, puesto que al formar parte de las uniones en hendidura, permiten que la comunicación entre células a través de sinapsis eléctricas sea extremadamente rápida, casi instantánea. En ese sentido, el aporte del tipo conexina 36 es muy importante, puesto que de todos los tipos descritos en mamíferos, alrededor de 16, es la que se encuentra más abundantemente a nivel de SNC (Belluardo *et al.*, 2000) y por ello, el determinar su distribución y niveles relativos en las distintas capas del BO permitiría identificar regiones donde pueden existir acoplamientos eléctricos entre las neuronas, con la consiguiente sincronización de ellas.

7.1 Presencia de la proteína conexina 36 en las diferentes capas del bulbo olfatorio.

La técnica de inmunohistoquímica utilizada en un principio no arrojó los resultados esperados, tanto por integridad del tejido como por especificidad de la marca obtenida. Por esta razón se probó otro anticuerpo y también se modificó el protocolo de inmunohistoquímica. Esta decisión, que también se basó en resultados publicados en la literatura, permitió obtener grados de marcas más específicas que claramente se diferenciaban entre las distintas capas del BO, además de una mayor integridad de los tejidos. Un ejemplo de esto se evidencia en la Figura 3 que muestra la diferencia de tinción entre los tejidos con anticuerpo primario y aquellos en que se omitió este paso.

Del total de las ratas consideradas en este estudio, 3 machos de 14 días y 3 machos de 2 meses, en todas ellas los resultados fueron congruentes indicando que la proteína conexina 36 se encuentra presente en las capas glomerular, plexiforme externa y mitral aunque con diferencias de intensidad si se comparan las capas dentro de cada edad. Estos resultados podrían explicar que la presencia de uniones en hendidura y más específicamente de la conexina 36 en la capa glomerular se puede atribuir a las sinapsis presentes en las estructuras que le dan nombre a esta capa; los glomérulos. En ellos se presentan sinapsis de tipo excitatorio, entre las aferencias olfatorias sensoriales primarias provenientes de las neuronas receptoras y las principales neuronas de proyección del BO, las células mitrales y en penacho. Además en esta capa se describe otro grupo celular, las células periglomerulares, asociadas a las células de proyección con las cuales generan sinápsis de tipo recíproca. Por otra parte, en la capa plexiforme externa, los procesos dendríticos de las células granulares sinaptan recíprocamente con las dendritas secundarias de las células mitrales y en penacho (Rall y Shepherd, 1968) en las cuales las mitrales liberan glutamato (neurotransmisor excitatorio) y las granulares GABA (neurotransmisor inhibitorio), sinápsis que sin duda podrían estar conformadas por la proteína conexina 36, sobretodo considerando las propiedades y características del tipo de sinapsis de que forman parte, las sinapsis eléctricas. Este tipo de sinapsis éxito-inhedoras de las células de proyección con células bulbares locales, presentes también en la capa glomerular, pueden modificar las descarga de las células de proyección que se dirigen a los centros superiores corticales (Ressler *et al.*, 1993). En tanto, en la capa mitral, conformada por los cuerpos neuronales de las células mitrales, la participación de la conexina

36 podría estar asociada a la proyección de la información olfatoria a través de los axones de dichas células, en dirección a los centros de integración encefálicos.

Estos resultados concuerdan con estudios de análisis ultraestructurales del glomérulo que confirman la presencia de uniones en hendidura en las dendritas apicales que permiten la unión mitral-mitral y que contienen conexina 36 (Christie *et al.*, 2005) además de uniones glutamatérgicas entre células mitrales y en penacho que contribuyen a la codificación de la información dentro del BO (Rash *et al.*, 2005). Sólo se presentan discrepancias con un trabajo de investigación (Zhang y Restrepo, 2003) que revela que existe presencia de la proteína en la capa del nervio olfatorio. Una posible explicación a estos resultados es que la técnica utilizada por los autores fue más bien inespecífica y es el único resultado discordante en la literatura. Además no nos parece (sólo evidencia) que pudiese existir presencia de esta proteína en esta capa, ya que está conformada por los axones de las células receptoras olfatorias presentes en el epitelio nasal y que se proyectan desde ahí al BO.

El análisis de la intensidad de la marca en la capa mitral no se realizó a pesar de una evidente marca debido a que esta capa formada por los cuerpos neuronales de las células mitrales y en penacho, que miden 40 μm , no forma una capa sólida que pueda ser fácilmente delimitada. De esta manera, la posibilidad de realizar una medición con el software utilizado claramente es inviable, solo se podría marcar célula por célula con la consecuente variabilidad en los resultados.

Se ha descrito que las células mitrales pueden expresar además de la Cx 36, al menos 2 conexinas más, la Cx 43 y la Cx 45 (Paternostro, *et al.*, 1995; Miragall *et al.*, 1996; Zhang y Restrepo, 2002). Aunque la significancia funcional de esas conexinas es desconocida, ellas participarían en el ensamblaje entre células mitrales e interneuronas inhibitorias locales (Paternostro, *et al.*, 1995; Kosaka y Kosaka, 2003).

7.2 Expresión del ARNm para conexina 36 en las diferentes capas del bulbo olfatorio.

El desarrollo y la aplicación de la técnica de hibridación in situ presentaron varias dificultades. En una primera etapa, la elaboración de la sonda de ARNm para conexina 36 requirió la repetición de algunas fases tales como la linearización o transcripción, con el consiguiente replanteamiento metodológico. Producto de ello fue necesario modificar algunos factores dentro de los procesos, tales como probar nuevas enzimas de restricción, modificar el tiempo y/o temperatura de incubación de las mismas, el volumen de la muestra, etc. Estas modificaciones nos permitieron llegar a obtener una concentración de sonda adecuada para desarrollar y obtener resultados en los experimentos de hibridación. Posteriormente, al realizar los experimentos de hibridación con tejidos de nuestro interés, se presentaron otras dificultades. Debido a que la sonda de ARNm es muy lábil y para evitar cualquier interacción indeseada entre ésta y un fijador de tejido, es que en una primera etapa intentamos obtener las muestras sin utilizar solución fijadora. Para ello extraíamos el cerebro y los bulbos olfatorios y los sumergíamos rápidamente en solución cerebroespinal artificial (SCEA), a 4°C para evitar así la progresiva acción enzimática. Luego, los bulbos y el cerebro se rodeaban de un medio para congelación (tissue freezing medium[®]) y se sumergían en isopentano (2 metil butano) previamente enfriado en acetona con hielo seco a una temperatura inferior a -50°C. Posteriormente se cortaba el tejido y se fijaban los cortes en paraformaldehído 4% en una solución fosfato salina por 15 minutos. Esta técnica no dio resultados, ya que los cortes se adherían de tal manera que era imposible individualizarlos. Para solucionar este problema fue necesario buscar otras alternativas a las que nos habíamos planteado, recurriendo a la literatura y a la experiencia de otros investigadores del medio (Dr. Fernando Torrealba, investigador de la Facultad de Ciencias, Universidad Católica; Dra. Eugenia Díaz, investigadora Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile). Luego de realizar algunas modificaciones, basadas principalmente en la utilización de una solución fijadora como el paraformaldehído y experimentando entre dos concentraciones, 3 y 4%, logramos mejorar sustancialmente la fijación del tejido empleando la menor concentración de fijador, 3%.

Una vez aplicada la sonda a los tejidos, tuvimos la dificultad que la marca lograda era inespecífica, puesto que al comparar cortes de tejido en los cuales se aplicó sonda contra los controles negativos, es decir tejidos en los cuales se omitió este paso, la tinción lograda era

prácticamente la misma. Para mejorar esto se probaron algunas modificaciones, las que se realizaron cambiando uno o dos factores para poder así identificar exactamente cual de ellos influía en una eventual mejora de la tinción. Fue así como pusimos mucho énfasis en el proceso de lavado entre las diferentes etapas, considerando que este factor es muy relevante en la obtención de una marca específica. Como no hubo variación en el resultado, probamos variando la concentración del líquido revelador, pero luego de unas cuantas modificaciones los resultados fueron nuevamente negativos. Debido a que varias de las pruebas habían resultado negativas y a limitaciones de tiempo y recursos para realizar cada hibridización, se decidió finalizar los experimentos de hibridización.

Nuestro interés en abordar esta técnica para localizar la presencia de conexina 36 y en específico su ARNm, se basó principalmente en complementar con información adicional los resultados positivos obtenidos con la técnica de inmunohistoquímica. Según la literatura previa, el ARNm para conexina 36 se encuentra en abundancia en el BO, específicamente en la capa mitral en donde se encuentra en mayor cantidad como también en la capa glomerular, específicamente en las células ubicadas en la periferia, tales como las periglomerulares y en penacho (Condorelli *et al.*, 1998, 2000), pero no está presente dentro del glomérulo (Belluardo *et al.*, 2000). Por otra parte también se ha descrito la presencia de ARNm para conexina 36 en las células granulares (Condorelli *et al.*, 1998; Belluardo *et al.*, 2000).

La detección de la expresión del gen de la Cx 36 también se podría haber realizado empleando técnicas alternativas. Tal es el caso de la hibridización *in situ* con sonda marcada con elementos radioactivos. Esta técnica, aún cuando presenta mayor sensibilidad, tiene como grandes desventajas las medidas de seguridad requeridas, el mayor costo respecto a la técnica con colorimetría y los extensos tiempos requeridos para la detección de las secuencias de hibridación ya que requieren de un mayor tiempo de exposición de las placas. Por otra parte, la técnica Dot Blot detecta secuencias de ARN hibridado en un lisado tisular lo que permite detectar la presencia del ARNm en la muestra, pero no permite determinar la región específica de expresión en un tejido (Sambrook *et al.*, 1989).

8 CONCLUSIONES

La presencia de la proteína conexina 36 en el bulbo olfatorio (BO) es ya una evidencia. Nuestros experimentos y los citados en la literatura así lo demuestran. Esta proteína forma parte de las uniones en hendidura, estructuras que se caracterizan principalmente por generar una rápida, casi instantánea comunicación entre células. Esto permite la sincronización de la actividad eléctrica entre poblaciones neuronales, que como se ha descrito en otras regiones del sistema nervioso, está asociada a la generación de actividad oscilatoria. Es importante destacar que de todos los tipos de conexinas descritas en mamíferos, ésta es la que se encuentra en mayor cantidad en el sistema nervioso central.

Numerosos estudios previos han dado cuenta que la presencia de oscilaciones en la banda gamma (30 a 100 Hz) son fundamentales en los procesos de discriminación e identificación olfatoria, permitiendo la generación de actividad sincrónica a nivel del BO de aquellas neuronas que son activadas por un mismo odorante. Por este motivo, nuestro análisis apunta a que la presencia de la proteína en las capas glomerular, plexiforme externa y mitral del BO, tanto en animales de 14 días como en aquellos de 2 meses, podría estar relacionada con la generación de oscilaciones en las neuronas mitrales o en penacho, además de la conectividad recíproca descrita en el BO, puesto que existen 2 redes inhibitorias, una a nivel de los glomérulos y otra a nivel de las dendritas secundarias de las células mitrales y en penacho. La función de estas redes está relacionada con la inhibición lateral por una parte y también con la retroinhibición sobre las células mitrales y en penacho. Además es posible que la coexistencia tanto de sinapsis entre los diferentes tipos de células del bulbo olfatorio, como la presencia de acoplamiento eléctrico a través de la presencia de la conexina 36 contribuyan a la sincronización de la descarga neuronal, con el consiguiente aporte en el proceso de discriminación e identificación olfatoria.

9 BIBLIOGRAFÍA

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. Molecular Biology of the Cell (4° Ed.). New York and London. Garland Science. 2002, Chap. V.

BEAR M., CONNORS B., PARADISO M. Neurociencia: explorando el cerebro. Editorial Barcelona. pp 198-208, 1998.

BELLUARDO N., MUDO G., TROVATO-SALINARO A., LE GURUN S., CHAROLLAIS A., SERRE-BEINIER V., AMATO G., HAEFLIGER J.A., MEDA P., CONDORELLI D.F. Expression of Connexin 36 in the adult and developing rat brain. Brain Research 865:121-138, 2000.

CHRISTIE J.M., BARK C., HORMUZDI S.G., HELBIG I., MONYER H., WESTBROOK G.L. Connexin 36 mediates spike synchrony in olfactory bulb glomeruli. Neuron 46(5):761-72, 2005.

CONDORELLI D.F., PARENTI R., SPINELLA F., TROVATO-SALINARO A., BELLUARDO N., CARDILE V., CICIRATA F. Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. European Journal of Neuroscience 10:1202-1208, 1998.

CONDORELLI D.F., BELLUARDO N., TROVATO-SALINARO A., MUDO G. Expression of Cx36 in mammalian neurons. Brain Research. Brain Research Reviews 32(1):72-85, 2000.

DEANS M.R., GIBSON J.R., SELITO C., CONNORS B.W., PAUL D.L. Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36. Neuron 31: 477-485, 2001.

DEGEN J., MEIER C., VAN DER GIESSEN R.S., SOHL G., PETRASCH-PARWEZ S., DERMETZEL R., SCHILLING K., DE ZEEUW C.I., WILLECKE K. Expression pattern of lacZ reporter gene representing connexin 36 in transgenic mice. The Journal of comparative neurology 473(4):511-525, 2004.

ENGEL A.K., SINGER W. Temporal binding and the neural correlates of sensory awareness. Trends in Cognitive Sciences 5(1):16-25, 2001

FREEMAN W.J. Spatial properties of an EEG event in the olfactory bulb and cortex. Electroencephalography and clinical neurophysiology 44(5):586-605, 1978.

GALARRETA M., HESTRIN S. Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. Nature Reviews Neuroscience 2(6): 425-433, 2001.

HORMUZDI S.G., PAIS I., LEBEAU F.E., TOWERS S.K., ROZOV A., BUHL E.H., WHITTINGTON M.A., MONYER H. Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice. Neuron 31:487-495, 2001.

KANDEL E., SCHWARTZ J., JESSELL T. Principles of neural science. (4° Ed.). McGraw-Hill. USA. 2000. Chap. 32. pp: 625-637.

KOSAKA T., KOSAKA K. Neuronal gap junctions in the rat main olfactory bulb, with special reference to intraglomerular gap junctions. Neuroscience Research 45 189-209, 2003.

LATORRE R., LÓPEZ-BARNEO J., BEZANILLA F., LLINÁS R. Biofísica y Fisiología Celular (1° Ed.) Sevilla, España. Universidad de Sevilla, secretariado de publicaciones, 1996. Cap. 17. pp: 407- 429.

LAURENT G. A systems perspective on early olfactory coding. Science 286: 723-728, 1999.

MACRIDES F., SCHOENFELD T.A., MARCHAND J.E., CLANCY A.N. Evidence for morphologically, neurochemically and functionally heterogeneous classes of mitral and tufted cells in the olfactory bulb. Chemical Senses 10: 175-202, 1985.

MALNIC B., HIRONO J., SATO T., BUCK L.B. Combinatorial receptor codes for odors. Cell 96(5):713-723, 1999.

MIRAGALL F., SIMBURGER E., DERMETZEL R. Mitral and tufted cells of the mouse olfactory bulb possess gap junctions and express connexin 43 mRNA. Neuroscience Letters 216: 199-202, 1996.

MORI K. Membrane and Synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb. Progress in neurobiology, 29: 275-320, 1987.

PATERNOSTRO M.A., REYHER C.K., BRUNJES P.C. Intracellular injections of Lucifer Yellow into lightly fixed mitral cells reveal neuronal dye-coupling in the developing rat olfactory bulb. Brain research Developmental brain research 84, 1-10, 1995.

PURVES D., AUGUSTINE G., FITZPATRICK D., KATZ L., LEMANTIA A., MCNAMARA J. Invitación a la neurociencia. Editorial Médica Panamericana, 2001. pp 288-300.

RALL W., SHEPHERD G. M. Theoretical reconstruction of field potentials and dendrodendritic synaptic interactions in olfactory bulb. Journal of Neurophysiology 31 (6): 884-915, 1968.

RASH J.E., DAVIDSON K.G., KAMASAWA N., YASUMURA T., KAMASAWA M., ZHANG C., MICHAELS R., RESTREPO D., OTTERSEN O.P, OLSON C.O., NAGY J.I. Ultrastructural localization of connexins (Cx36, Cx43, Cx45), glutamate receptors and aquaporin-4 in rodent olfactory mucosa, olfactory nerve and olfactory bulb. Journal of Neurocytology 34 (3-5): 307-341, 2005.

RESSLER K.J., SULLIVAN S.L., BUCK L.B. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. Cell 73 (3):597-609, 1993.

ROZENTAL R., GIAUME C., SPRAY D.C. Gap junctions in the nervous system. Brain Research 32: 11-15, 2000.

SAMBROOK J., FRITSCH E., MANIATIS T. Molecular cloning a laboratory manual. (2° Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 1989.Chap. 7. pp: 7.54-7.57.

SRINIVAS M., ROZENTAL R., KOJIMA T., DERMIETZEL R., MEHLER M., CONDORELLI D.F., KESSLER J.A., SPRAY D.C. Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction protein connexin 36. The Journal of Neuroscience 19 (22): 9848-9855, 1999.

ZHANG C., RESTREPO D. Expression of connexin 45 in the olfactory system. Brain Research 929: 37-47, 2002.

ZHANG C., RESTREPO D. Heterogeneous expression of connexin 36 in the olfactory epithelium and glomerular layer of the olfactory bulb. The Journal of Comparative Neurology 459: 426-439, 2003.