

UCH-FC  
DOC-B  
M 183  
C. 1

**MECANISMO DE LA RESPUESTA INHIBITORIA A ODORANTES  
EN NEURONAS OLFATORIAS DE *Caudiverbera caudiverbera***

Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y  
Neurociencia

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



FACULTAD DE CIENCIAS

por

Rodolfo Madrid Montecinos

Julio, 2001

Director de Tesis: Dr. Juan Bacigalupo Vicuña

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

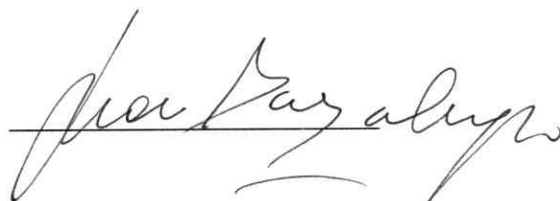
Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Rodolfo Leonardo Madrid Montecinos

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de defensa de Tesis rendido el 23 de Mayo de 2001.

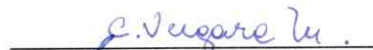
Director de Tesis:

Dr. Juan Bacigalupo



Comisión de Evaluación de Tesis:

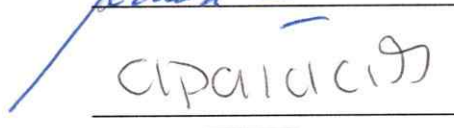
Dr. Cecilia Vergara (Presidente)



Dr. Ramón Latorre



Dr. Adrián Palacios



Dr. Andrés Stutzin



..... a mi madre, Flor Montecinos Barrera.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, en especial a mi madre, quién ha dado todo de sí para que yo logre esta meta; esta Tesis es para ella. Quiero dar las gracias también a mi hermanito hermoso, por ser como es, por enseñarme a dar amor, y a mi padre, mis más infinitas gracias.

A mis amigos Martín Carmona, Javier González, Claudio Solís y Carlos Rozas, por estar conmigo siempre, por ser los 4 fantásticos.

A Marcela, mi compañera de tantos años, por el amor y la fuerza. A Joan, por entrar en mi vida. A Isabella, mi gran amiga, gracias.

A mi tutor, Juan Bacigalupo, por su paciencia, por enseñarme su modo de hacer ciencia, por todo su apoyo, ayuda y amistad.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, Magdalena Sanhueza, Oliver Schmachtenberg, Javier Díaz, Gloria Rojas, Danny Acevedo, Ricardo Delgado, Lorena Sülz y muy especialmente a mi “vecino”, Gonzalo Ugarte por ser Gonzalo. Gracias a todos por su amistad, ayuda, humor y cariño.

Al Dr. Ramón Latorre, por enseñar con el ejemplo cómo se debe trabajar en ciencia y por todo su apoyo y ayuda de siempre.

A los Profesores Osvaldo Álvarez, Cecilia Vergara y Daniel Wolff por toda su ayuda y sabios consejos. A mis amigos Andrés Oberhauser y Peter O'Day, por su apoyo incondicional.

A los que ya no están en el lab, a mis amigos, gracias.

Esta Tesis se llevó a efecto gracias a la Beca de Doctorado CONICYT y los Proyectos FONDECYT #2990003 y #4000014 (**Rodolfo Madrid**), además del Proyecto FONDECYT #1990938, la Cátedra Presidencial en Ciencias y el Proyecto ICM P99-031 del Instituto Milenio CBB (**Juan Bacigalupo**).

A todos, gracias.

## ÍNDICE DE MATERIAS

MATERIA	Página(s)
Abreviaturas y Símbolos	3 - 4
Lista de Figuras y Tablas	5 - 7
Resumen	8 - 9
Abstract	10 - 11
Introducción	12 - 36
Hipótesis de Trabajo	37
Objetivos Específicos	37
Métodos	38 - 45
Resultados	46 - 81
Discusión	82 - 97
Conclusiones Generales	98
Bibliografía	99 - 108

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AMPc :	Adenosín-3,5-monofosfato cíclico
ATP :	Adenosín-5'-trifosfato
CNGC :	Conductancia catiónica no selectiva activada por nucleótidos cíclicos
CTX :	Caribdotoxina
DIDS :	Ácido 4,4'-Diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico
GMPc :	Guanosín-3,5-monofosfato cíclico
GΩ :	Gigaohm, 10 <sup>9</sup> ohm
I :	Corriente
I <sub>mant</sub> :	Corriente de mantención
IbTx :	Iberiotoxina
InSP <sub>3</sub> :	Inositol 1,4,5-trisfosfato
M :	Molar (moles/litro de solución)
mV :	Milivolts, 10 <sup>-3</sup> Volts
ms :	Milisegundos, 10 <sup>-3</sup> segundos
μM :	Micromolar, 10 <sup>-6</sup> Molar
μm :	Micrometro, 10 <sup>-6</sup> metros
nM :	Nanomolar, 10 <sup>-9</sup> Molar
NO :	Neurona olfatoria

pA	:	Picoamperios, $10^{-12}$ Amperios
pF	:	Picofaradios, $10^{-12}$ Faradios
R <sub>entr</sub>	:	Resistencia de entrada
s	:	Segundo
TEA	:	Tetraetilamonio
TTx	:	Tetrodotoxina
UV	:	Ultravioleta
V	:	Volt
V <sub>mant</sub>	:	Potencial de mantención
V <sub>mem</sub>	:	Potencial de membrana
V <sub>rep</sub>	:	Potencial de reposo



## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1.** Esquema del epitelio olfatorio e imagen de una neurona olfatoria aislada.
- Figura 2.** Arreglo experimental.
- Figura 3.** Corrientes dependientes de potencial en la NO.
- Figura 4.** Neuronas tónicas y fásicas en el epitelio olfatorio de *Caudiverbera*.
- Figura 5.** La respuesta excitatoria a odorantes.
- Figura 6.** La respuesta Inhibitoria a odorantes.
- Figura 7.** Estructura química de los principales odorantes utilizados.
- Figura 8.** Corrientes de cola en respuesta a odorantes pútridos.
- Figura 9.** Incrementos de  $Ca^{2+}$  intraciliar inducidos por odorantes pútridos.
- Figura 10.** Efecto de la liberación de AMPc desde el compuesto enjaulado en NOs.
- Figura 11.** Corrientes de entrada activadas por odorantes pútridos.

**Figura 12.** Diversos patrones de corrientes de célula completa inducidas por  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado.

**Figura 13.** La corriente de salida activada por  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado tiene dos componentes: uno es sensible a ácido niflúmico y el otro es sensible a IbTx.

**Figura 14.** La corriente de salida activada por  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado es sensible a CTx.

**Figura 15.** Las conductancias activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado residen en los cilios olfatorios.

**Figura 16.** El  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado puede inducir tanto respuestas despolarizantes como hiperpolarizantes en diferentes NOs.

**Figura 17.** La corriente de salida activada por AMPc desenjaulado tiene dos componentes.

**Figura 18.** La corriente de  $\text{K}^+$  inducida por odorantes es sensible a LY83583 y SQ22536.

**Figura 19.** La corriente de  $\text{K}^+$  activada por odorantes puede ser insensible a SQ22536.

**Figura 20.** Efecto de odorantes pútridos en NOs carentes de cilios.

**Figura 21.** Corrientes de  $\text{K}^+$  inducidas por odorantes pútridos en NOs sin cilios.

**Figura 22.** Efecto de  $\text{InsP}_3$  liberado desde un compuesto jaula en NOs.

**Figura 23.** Modelo propuesto para la respuesta inhibitoria a odorantes.

**Figura 24.** Resumen del efecto de los odorantes en la NO aislada.

**Figura 25.** Incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por despolarización y por la corriente excitatoria en NOs.

**Tabla 1.** Canales iónicos en la transducción de odorantes en *Caudiverbera*.

**Tabla 2:** Corrientes inhibitorias y sus propiedades.

**MECANISMO DE LA RESPUESTA INHIBITORIA A ODORANTES EN  
NEURONAS OLFATORIAS DE *Caudiverbera caudiverbera***

**RESUMEN**

Una gran variedad de odorantes pueden inducir tanto respuestas excitatorias como inhibitorias en las neuronas olfatorias de *Caudiverbera caudiverbera*. La inhibición consiste en una disminución transitoria de la frecuencia de descarga de potenciales de acción frente al estímulo odorífero. La respuesta inhibitoria es el resultado del desarrollo de un potencial de receptor hiperpolarizante, consecuencia de la activación de una conductancia de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  [Morales *et al.*, 1994]. Utilizando diversos tipos de estímulos con diferentes clases de odorantes y usando diferentes agentes farmacológicos, mostramos que los odorantes pútridos, previamente asociados a la respuesta inhibitoria, pueden activar la conductancia catiónica no selectiva dependiente de nucleótidos cíclicos (CNGC) involucrada en la respuesta excitatoria. Además mostramos que, al igual que los odorantes de tipo floral y frutal, los odorantes pútridos son capaces de inducir incrementos de  $Ca^{2+}$  intracelular en los cilios olfatorios. También mostramos que la activación de la corriente de  $K^+$  inhibitoria es sensible a drogas que afectan la vía de transducción del adenosín monofosfato cíclico (AMPC), tales como

LY83583 (bloqueador de la CNGC) y SQ22536 (inhibidor de la adenilil ciclasa). Utilizando  $\text{Ca}^{2+}$  enjaulado, mostramos que una elevación en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  activa una conductancia de  $\text{Cl}^-$  sensible a DIDS ( $\mu\text{M}$ ) y ácido niflúmico ( $\mu\text{M}$ ), así como también una conductancia de  $\text{K}^+$  sensible a IbTx (nM) y CTx (nM), y determinamos que ambas conductancias residen en los cilios olfatorios. Bajo condiciones de corriente controlada, al desenjaular  $\text{Ca}^{2+}$  se indujo una despolarización o una hiperpolarización de la membrana dependiendo de la célula. Utilizando AMPc enjaulado, mostramos que la corriente inhibitoria puede ser activada a 0 mV (el potencial de reversión de la corriente de  $\text{Cl}^-$ ) en presencia de ácido niflúmico, un bloqueador de la conductancia de  $\text{Cl}^-$  excitatoria. Nuestros resultados son consistentes con la idea de que tanto una conductancia excitatoria de  $\text{Cl}^-$  como una conductancia inhibitoria de  $\text{K}^+$ , ambas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y con efectos opuestos sobre el potencial de membrana, pueden ser activadas en respuesta a incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por odorantes a través de la vía de transducción dependiente de AMPc. Por otro lado, encontramos que una corriente de  $\text{K}^+$  somática puede ser activada también por odorantes en estas células, de un modo independiente de la cascada de AMPc. Así, la activación de la corriente de  $\text{K}^+$  ciliar a través de la vía del AMPc podría ir acompañada de la activación directa de canales de  $\text{K}^+$  por odorantes pútridos en la membrana plasmática no ciliar.

## ABSTRACT

In *Caudiverbera* olfactory receptor neurons, a large variety of odorants may induce both excitatory and inhibitory responses. Inhibition consists on a transient decrease in action potential firing induced by an odorant stimulus. The inhibitory response is the result of a hyperpolarizing receptor potential induced by the activation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  conductance [Morales *et al.*, 1994]. Using a variety of odor stimuli with different classes of odorants and utilizing different pharmacological agents, we show that the putrid odorants, previously associated with the inhibitory response, can activate the non-selective cyclic nucleotides gated (CNG) conductance involved in the excitatory response. Furthermore, we show that putrid odorants are capable of inducing an increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in the olfactory cilia, as do floral and fruity odorants. We also show that the activation of the inhibitory  $\text{K}^+$  conductance is sensitive to drugs affecting the activation of the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) pathway, as LY83583 (a CNG channel blocker) and SQ22536 (adenylyl cyclase inhibitor). Using caged  $\text{Ca}^{2+}$ , we show that a rise in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  activates the excitatory  $\text{Cl}^-$  conductance sensitive to DIDS ( $\mu\text{M}$ ) and niflumic acid ( $\mu\text{M}$ ), as well as a  $\text{K}^+$  conductance sensitive to IbTx (nM) and CTx (nM), and that these conductances reside in the cilia. Under I-clamp whole-cell conditions, uncaging  $\text{Ca}^{2+}$  induced a depolarization or a hyperpolarization, depending on the cell. Using caged cAMP, we show that the inhibitory current can be activated at 0

mV (the  $\text{Cl}^-$  current reversal potential) in the presence of niflumic acid, a blocker to the excitatory  $\text{Cl}^-$  current). Our results are consistent with the notion that an excitatory  $\text{Cl}^-$  conductance and an inhibitory  $\text{K}^+$  conductance, both  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and with opposite effects on membrane potential, can be activated in response to  $\text{Ca}^{2+}$  increases induced by odorants through the cAMP-dependent pathway. On the other hand, we also show that a somatic  $\text{K}^+$  conductance can be activated by putrid odorants in a cAMP-independent manner. The activation of the ciliary  $\text{K}^+$  currents through the cAMP pathway would coexist with that due to the direct activation of  $\text{K}^+$  channels by putrid odorants in the non-ciliary plasma membrane.

## INTRODUCCIÓN

En las neuronas olfatorias de *Caudiverbera*, los estímulos odoríferos pueden inducir tanto respuestas excitatorias como inhibitorias. La respuesta excitatoria involucra la activación de una conductancia catiónica no selectiva dependiente de AMPc (CNGC), y la subsecuente activación de otra conductancia, también despolarizante, de Cl<sup>-</sup> dependiente de Ca<sup>2+</sup>. Ambas conductancias dan cuenta del potencial de receptor despolarizante, que causa un incremento en la descarga de potenciales de acción de la neurona [Nakamura y Gold, 1987; Firestein y Werblin, 1989; Kurahashi, 1989; Kurahashi y Yau, 1993; Revisado en Schild y Restrepo, 1998]. La respuesta inhibitoria, por su parte, involucra la participación de una conductancia de K<sup>+</sup> dependiente de Ca<sup>2+</sup> que es responsable del desarrollo de un potencial de receptor hiperpolarizante, que provoca el cese transitorio de la actividad eléctrica de la célula [Morales *et al.*, 1994]. Estudios electrofisiológicos realizados a fines de la década de los 60, utilizando técnicas de registro extracelular en la mucosa olfatoria, sugirieron que ciertos odorantes inhiben la actividad eléctrica de las neuronas olfatorias de vertebrados [Gesteland *et al.*, 1965; O'Connell y Mozell, 1969]. Evidencias posteriores, obtenidas en neuronas aisladas del salamándrido *Necturus* en condiciones de corriente controlada, confirmaron esta observación [Dionne, 1992]. Sin embargo, hasta ahora el mecanismo de quimiotransducción responsable de esta respuesta no



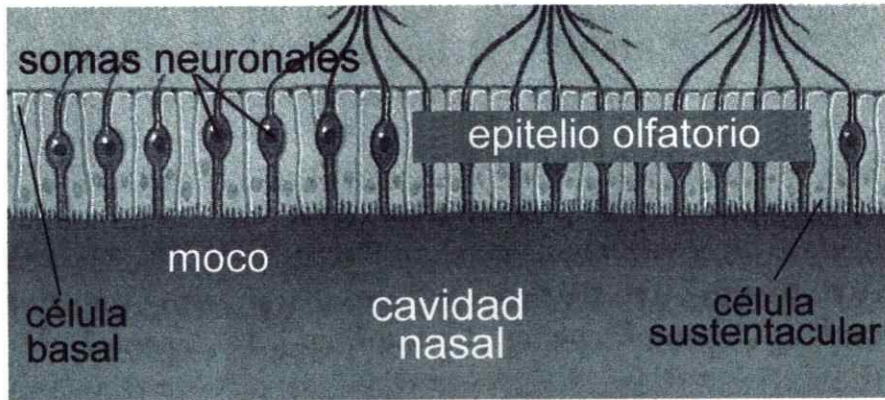
había sido aclarado. Nuestro trabajo previo en el estudio de la respuesta inhibitoria mostró que una conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por odorantes participa incrementando la conductancia de  $\text{K}^+$  responsable de la inhibición [Morales *et al.*, 1997; Bacigalupo *et al.*, 1997]. También mostramos que la magnitud de la corriente de  $\text{K}^+$  inhibitoria es proporcional a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y sensible a bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , como la nifedipina. Postulamos que la activación de esta conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  es la responsable de la activación de la conductancia de  $\text{K}^+$  inhibitoria. La identidad de esta conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  y el mecanismo subyacente a su activación eran, sin embargo, desconocidos. Más aún, no había evidencia directa que demostrara que los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares que ocurrían durante la respuesta a odorantes activan la conductancia de  $\text{K}^+$  inhibitoria. Utilizando la liberación controlada de mensajeros secundarios desde compuestos jaula y usando diversos agentes farmacológicos, hemos determinado que la activación de la corriente de  $\text{K}^+$  ciliar inhibitoria depende de la activación de la CNGC por la vía del AMPc. Además, un segundo mecanismo inhibitorio involucraría la activación directa de una conductancia de  $\text{K}^+$  somática por odorantes pútridos, de un modo independiente de la cascada del AMPc. Postulamos un modelo que integra y explica nuestras observaciones y documenta la considerable complejidad de la quimiostransducción olfativa.

## **Antecedentes Bibliográficos**

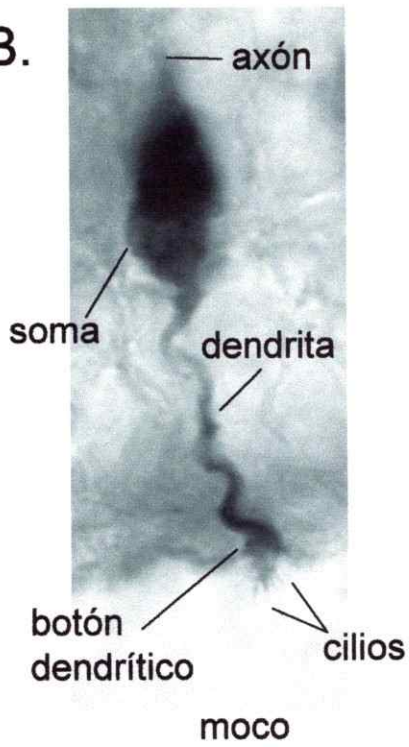
### **Organización celular del epitelio olfatorio**

Los primeros pasos de la olfacción se realizan en la mucosa olfatoria. Esta mucosa es un neuroepitelio del tipo columnar pseudoestratificado compuesto de tres tipos de células: células sustentaculares, células basales y neuronas olfatorias (NOs) (Figura 1A). Las NOs poseen la maquinaria molecular que se encarga de la transformación de la señal química (los odorantes) en una señal eléctrica, la que posteriormente viaja hacia los centros superiores de integración. Son células bipolares desde cuyo soma se proyecta una dendrita hacia la superficie del epitelio, la que despliega un ensanchamiento en su extremo distal llamado botón dendrítico (Figura 1B). De este botón nace un número variable de cilios (5 - 20) (Figura 1C), con la estructura microtubular característica de estos organelos  $(9 \times 2) + 2$ . Desde el extremo basal del soma se proyecta un delgado axón amielínico que atraviesa la lámina criboida del hueso etmoides alcanzando el bulbo olfatorio, donde hace sinapsis con las dendritas de las células mitrales. De esta forma se genera en el bulbo el complejo sináptico globular llamado glomérulo olfativo. En esta zona se integra la información proveniente de las neuronas olfatorias, las que son el primer nivel de la codificación olfativa. A su vez, los axones de las células mitrales se proyectan a la corteza olfatoria.

A.



B.



C.

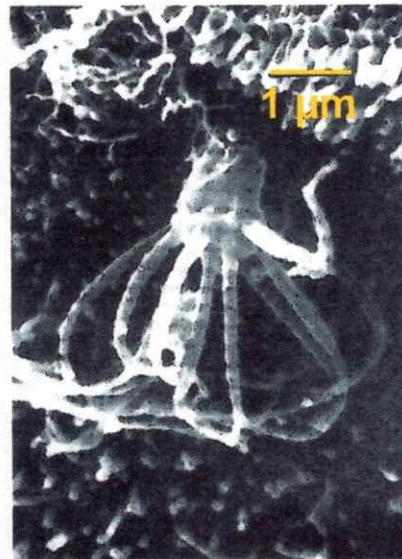


Figura 1

**Figura 1. Esquema del epitelio olfatorio e imagen de una neurona olfatoria aislada.** A. Ubicación y orientación de las NOs en el epitelio. B. Una NO en el epitelio (teñida por la reacción de la NADPH diaforasa, gentileza de O. Schmachtenberg) mostrando su soma, axón, dendrita, botón dendrítico y cilios. C. Microfotografía electrónica mostrando una aproximación de la zona de los cilios y el botón dendrítico (modificada de Morrison y Constanzo, 1990).

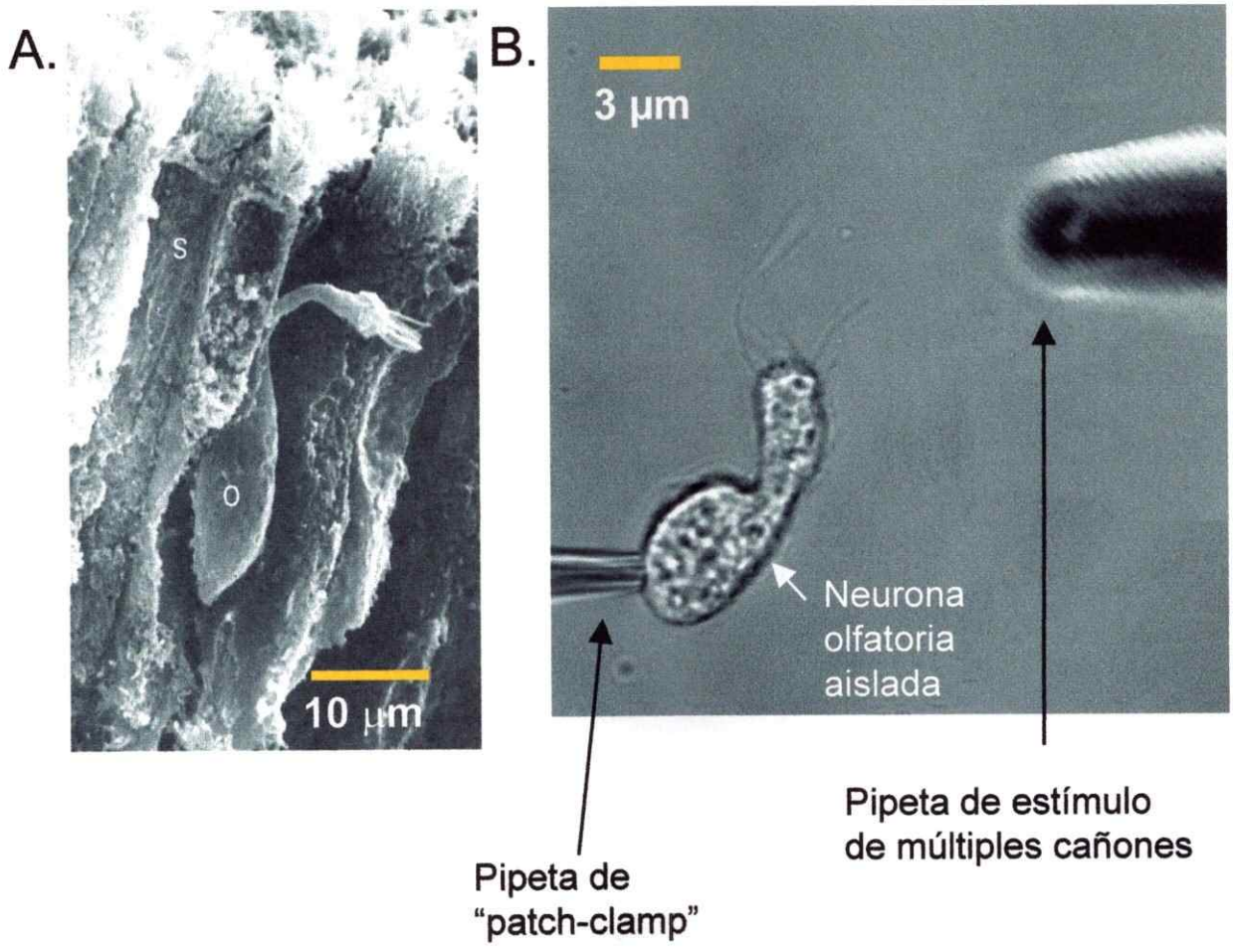


Figura 2

**Figura 2. Arreglo experimental.** A. Microfotografía electrónica de una NO en el epitelio olfatorio (modificada de Kandel *et al.*, 2000) B. NO aislada del epitelio olfatorio de *Caudiverbera* por disociación mecánica. La NO aislada conserva su forma y propiedades eléctricas y quimiosensoras. En esta figura se muestra el arreglo experimental usado en esta Tesis, con la pipeta de registro y la pipeta de estímulo.

Las células sustentaculares del epitelio olfatorio tienen forma alargada, se extienden a todo lo ancho del neuroepitelio y presentan microvellocidades en el extremo apical. Estas son células de sostén no excitables que rodean a las neuronas olfatorias. A diferencia de lo encontrado en mamíferos, las células sustentaculares de los anfibios contribuyen a la formación del moco de la cavidad nasal, medio donde se encuentran inmersos los cilios olfatorios. Las células basales del neuroepitelio tienen forma redondeada y se localizan en la región basal de éste, constituyendo su reserva neurogénica. La pérdida de las neuronas olfatorias, debida a daños producidos por su exposición al medio ambiente o senescencia, promueve la proliferación y diferenciación de una población de células basales, las que dan origen a las neuronas olfatorias que reemplazan a las dañadas.

Las NOs (Figura 2A) pueden ser aisladas mecánicamente del epitelio olfatorio; las NOs así obtenidas conservan su forma, propiedades eléctricas y capacidad de transducir odorantes (Figura 2B).

### **Corrientes dependientes del potencial en las NOs.**

En la generación de un potencial de acción en las NOs participan las siguientes corrientes: una corriente de entrada transitoria portada por  $\text{Na}^+$ , una corriente de entrada mantenida portada por  $\text{Ca}^{2+}$  y dos o más corrientes de salida portadas por  $\text{K}^+$ . Entre estas últimas se encuentran: una corriente tipo "A" que se inactiva, una corriente de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y una corriente de  $\text{K}^+$  tipo "rectificador tardío" [Trotier, 1986; Firestein y Werblin, 1987; Delgado y Labarca, 1993]. Estas dos últimas corrientes de  $\text{K}^+$

están presentes en las NOs de *Caudiverbera caudiverbera*, el modelo de vertebrado utilizado en esta Tesis. La corriente tipo A se encuentra en la rata, la que también presenta las otras dos corrientes de  $K^+$  mencionadas.

Corrientes de sodio dependientes del potencial. Los reportes de la conductancia de  $Na^+$  dependiente de potencial en NOs indican que en las diferentes especies animales ésta presenta algunas diferencias, ya sea en su grado de sensibilidad por tetrodotoxina (TTx) [Firestein y Werblin, 1987; Schild, 1989; Miyamoto *et al.*, 1992; Dawson *et al.*, 1993], en el potencial de membrana al cual se activa [Schild, 1989; Miyamoto *et al.*, 1992; Delgado y Labarca, 1993; Pun *et al.*, 1994], en la amplitud máxima que ésta puede alcanzar o en su distribución a lo largo de la neurona [Maue y Dionne, 1987; Duvin y Dionne, 1994]. La corriente de  $Na^+$  es la responsable de la fase despolarizante del potencial de acción de la NO en todas las especies estudiadas.

Corriente de calcio dependiente de potencial. La corriente de  $Ca^{2+}$  en las NOs ha sido descrita también en varias especies [Firestein y Werblin, 1987; Schild, 1989; Trombley y Westbrook, 1991; Delgado y Labarca, 1993]. La amplitud de esta corriente es relativamente pequeña, y en la configuración de célula completa ("whole-cell") de la técnica de "patch-clamp", la corriente máxima decrece con una constante de tiempo de varios minutos [Schild, 1989]. La corriente de  $Ca^{2+}$  comienza a activarse entre los -40 y -30 mV, y alcanza su amplitud máxima alrededor de los 0 mV. Los canales de  $Ca^{2+}$  son por lo tanto activados durante el potencial de acción, y la entrada de  $Ca^{2+}$  resultante



contribuye primero a la despolarización y luego a la repolarización de la membrana activando los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ . Estos canales de  $Ca^{2+}$  están localizados preferentemente en la membrana plasmática del soma y de la dendrita, sin descartarse la posibilidad que una pequeña porción de ellos se encuentre en otras regiones de la membrana plasmática neuronal, como por ejemplo el botón dendrítico [Schild *et al.*, 1994].

Corrientes de potasio. La repolarización del potencial de membrana durante un potencial de acción se logra por la activación de varias corrientes de  $K^+$ : i) una corriente de  $K^+$  que se activa e inactiva rápidamente a potenciales más positivos que el umbral de activación de los canales de  $Na^+$  y que es sensible a 4-aminopiridina; esta corriente ha sido descrita a la fecha en NOs de varias especies animales [Firestein y Werblin, 1987; Lucero *et al.*, 1992; Nevitt y Moody, 1992; Miyamoto *et al.*, 1992]. ii) un canal de  $K^+$  con características similares al canal de  $K^+$  rectificador tardío, que se activa a potenciales cercanos a -20 mV. iii) Un tercer tipo de canales de  $K^+$ , canal de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$ , ha sido descrito a la fecha en varias especies [Firestein y Werblin, 1987; Maue y Dionne, 1987; Nevitt y Moody, 1992; Delgado y Labarca, 1993]. Los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de potencial aparecen jugando un papel preponderante en la activación de estos canales de  $K^+$ , ya que el bloqueo de la corriente de  $Ca^{2+}$  [Schild, 1989; Delgado y Labarca, 1993] o la disminución de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de estos canales [Firestein y Werblin, 1987; Nevitt y Moody 1992] reduce o elimina la componente dependiente del

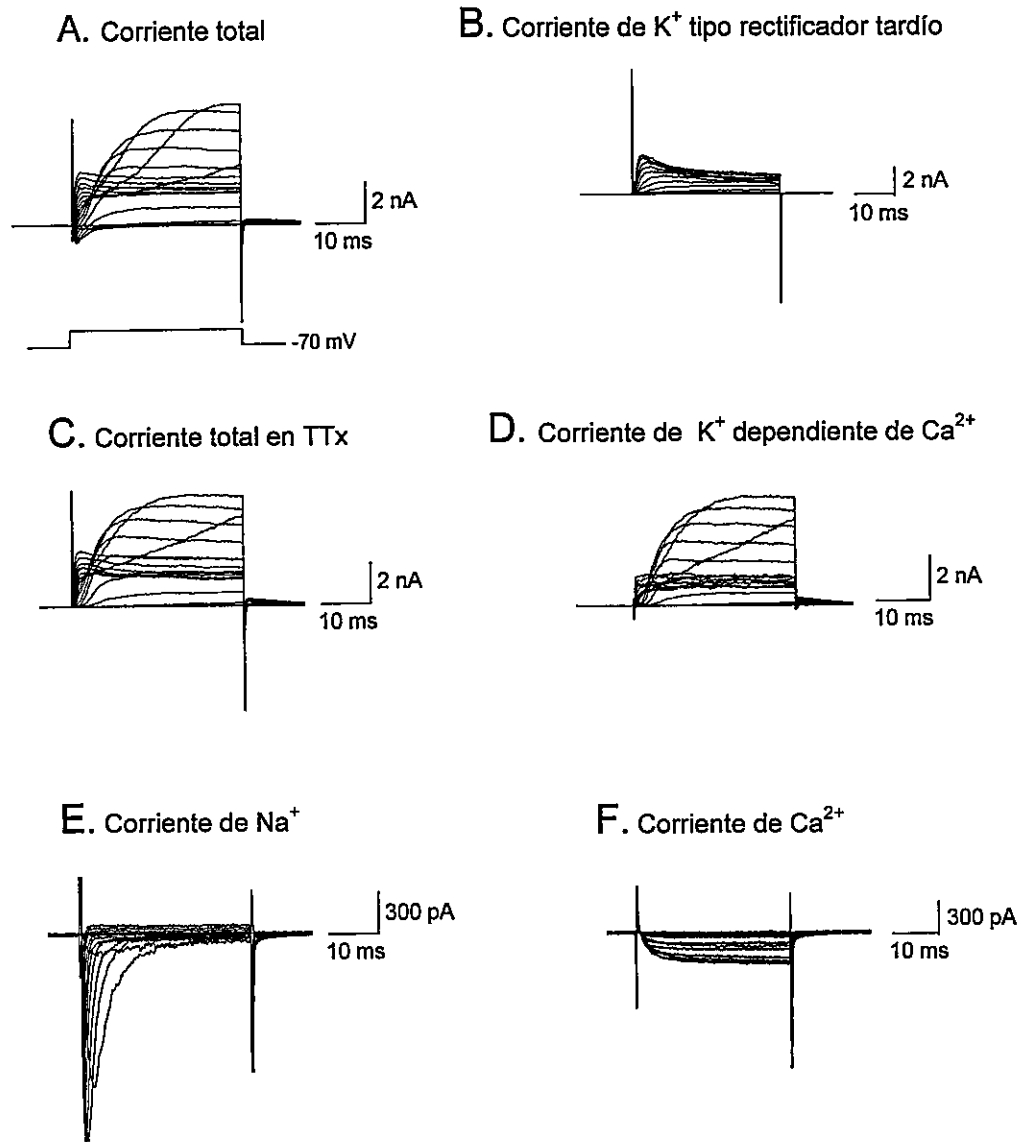


Figura 3

**Figura 3. Corrientes dependientes de potencial en la NO.** A. Corrientes de célula completa bajo condiciones iónicas normales. B. La corriente de  $K^+$  tipo rectificador tardío es observada bajo Ringer normal suplementado con 2 nM de TTx y 0.1 mM  $Cd^{2+}$ . C. Las corrientes registradas bajo Ringer-TTx. D. La corriente de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  se obtuvo sustrayendo las corrientes en B de aquellas obtenidas registrando en Ringer suplementado con 2 nM TTx, mostradas en C. E. La corriente de  $Na^+$  es obtenida bajo Ringer normal suplementado con 0.1 mM  $Cd^{2+}$  y con una solución interna en la cual el  $K^+$  fue reemplazado por  $Cs^+$ . F. La corriente de  $Ca^{2+}$ , fue registrada después del reemplazo del  $Na^+$  externo por NMDG y del  $K^+$  por  $Cs^+$  en la solución interna.

divalente de las corrientes de  $K^+$ . Los dos últimos canales de  $K^+$  mencionados están presentes en las NOs de *Caudiverbera* [Delgado y Labarca, 1993].

En la figura 3A se presenta la familia de corrientes gatilladas por voltaje en soluciones interna y externa normales en una NO. Agregando 2 nM de TTx y 0.1 mM  $Cd^{2+}$  a la solución Ringer, la misma célula exhibe solamente la corriente de  $K^+$  que es independiente de  $Ca^{2+}$ , esto es, la corriente de  $K^+$  tipo rectificador tardío (Figura 3B). Con el fin de obtener el componente de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$ , registramos las corrientes de célula completa obtenidas en 2 nM TTx y solución interna normal (Figura 3C) y sustrajimos a esta corriente el componente tipo rectificador tardío mostrado en 3B (Figura 3D). Estas corrientes contienen no sólo la componente de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  sino que también la corriente de  $Ca^{2+}$  dependiente de voltaje, pero la magnitud de este último componente es despreciable comparada con el de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  [Madrid *et al.*, en preparación]. La corriente de  $Na^+$  fue obtenida en otra NO cuyos parámetros eléctricos fueron muy similares a aquellos medidos en la célula previamente mostrada. Esta corriente se obtuvo adicionando 0.1 mM  $Cd^{2+}$  a la solución externa y sustituyendo el  $K^+$  de la solución interna por  $Cs^+$  (Figura 3E). La corriente de  $Ca^{2+}$  sostenida fue resuelta reemplazando el  $Na^+$  de la solución externa por NMDG y conservando el  $Cs^+$  en la solución interna (Figura 3F).

### **Neuronas olfatorias tónicas y fásicas en el epitelio olfatorio de *Caudiverbera*.**

Las NOs despliegan diversos patrones de respuestas eléctricas cuando son estimuladas con exposiciones prolongadas de odorantes que aumentan su frecuencia de disparo, o

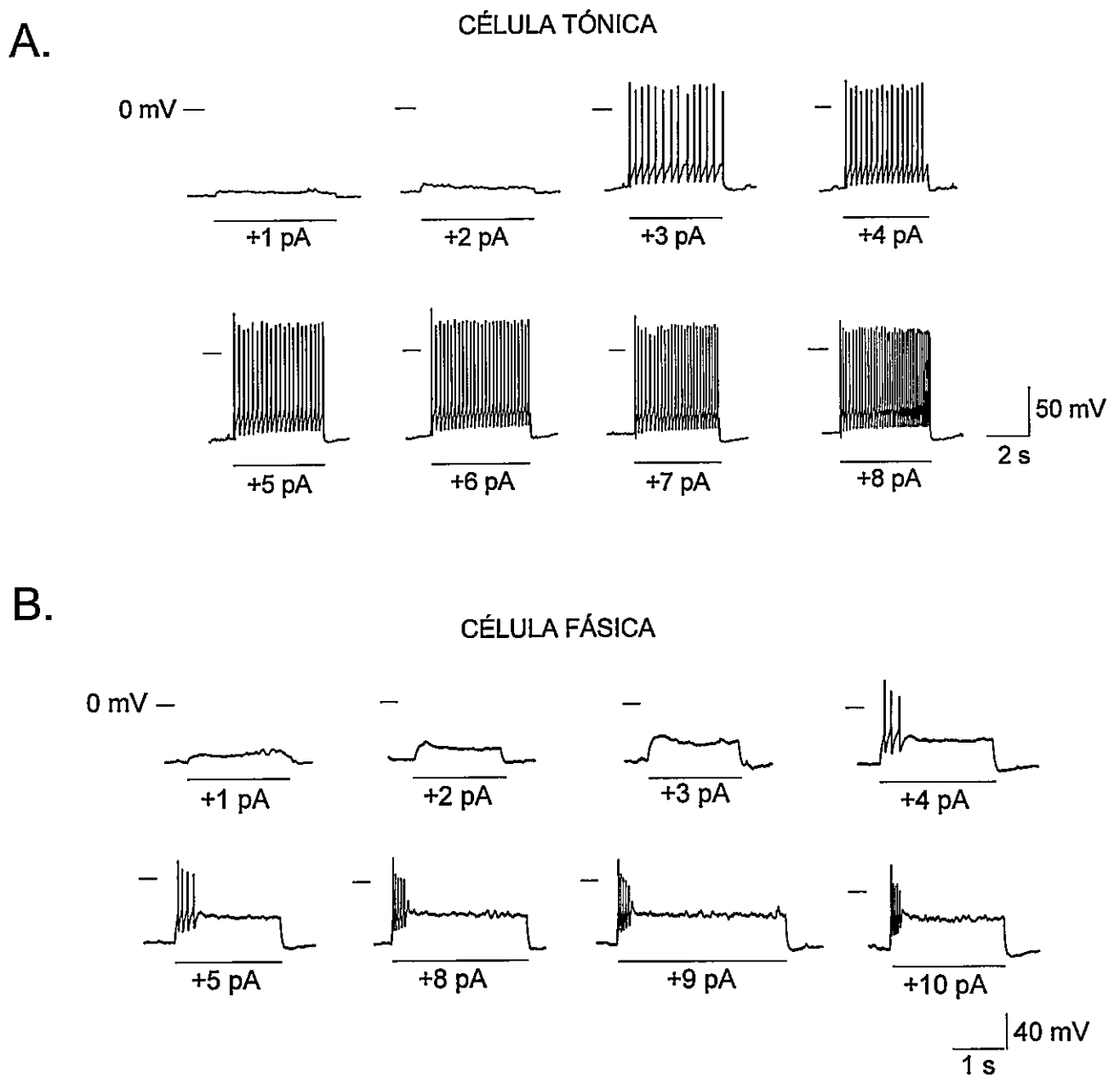


Figura 4

**Figura 4. Neuronas tónicas y fásicas en el epitelio olfatorio de *Caudiverbera*. A.** Respuestas de una neurona tónica a una secuencia de pulsos de corriente despolarizante de magnitud creciente. B. Respuestas de una neurona fásica a una serie similar de pulsos.

con pulsos sostenidos de corriente despolarizante. Estos patrones de disparo van desde unos pocos potenciales de acción que cesan rápidamente (incluso estando el estímulo eléctrico u odorífero presente), hasta trenes sostenidos de disparo que se mantienen durante todo el tiempo que dura el estímulo. Las figuras 4A y 4B muestran el comportamiento de una neurona tónica y otra fásica frente pulsos despolarizantes de magnitud creciente. La célula tónica de la figura 4A desplegó un tren de disparo regular y sostenido durante el tiempo total de estimulación. En contraste, la célula fásica representada en la figura (Figura 4B) presentó 4 a 5 potenciales de acción después del inicio de la despolarización, manteniéndose el potencial de la membrana a un valor despolarizado estable hasta el final del estímulo. En las neuronas fásicas, la amplitud de los potenciales de acción decrece gradualmente desde el primero hasta el último de éstos. El comportamiento tónico o fásico fue evidente en cada caso cuando el tamaño del pulso despolarizante superó el umbral que induce en cada célula el inicio de la descarga de potenciales de acción. Esta diversidad en los patrones de respuesta eléctrica de la NO frente a la estimulación química y eléctrica de tipo excitatoria está relacionada con sus propiedades pasivas de membrana, particularmente su potencial de reposo y su resistencia de entrada, independientemente de sus mecanismos de quimiotransducción [Madrid *et al.*, en preparación].

### **Proteínas receptoras de odorantes y proteínas G en la olfacción.**

No obstante que algunas evidencias, obtenidas por reconstitución de canales iónicos en bicapas lipídicas planas, muestran la activación directa de canales iónicos por odorantes

en cilios olfatorios de rata y de sapo [Vodyanoy y Murphy, 1983; Labarca *et al.*, 1988], existe consenso en que los diferentes odorantes son detectados vía receptores acoplados a proteína G, que controlan la producción de mensajeros secundarios intracelulares. Éstos a su vez regulan la actividad de los canales iónicos involucrados en la transducción [Firestein *et al.*, 1991a, b; Ache, 1994; Restrepo *et al.*, 1996], y cuya activación determina la modificación de la permeabilidad iónica de la membrana en respuesta a odorantes.

Receptores a odorantes. Estudios bioquímicos [Rhein y Cagan, 1983] y neurofisiológicos realizados en peces [Caprio y Byrd, 1984], sumados a que en humanos existen diversos cuadros clínicos de anosmia (incapacidad de percibir ciertos olores) sugirieron la participación de receptores a los diversos odorantes en el proceso de transducción olfatoria. El desarrollo más relevante acerca de la naturaleza de los receptores a agentes odorantes en vertebrados provino del trabajo de Buck y Axel (1991) en neuronas olfatorias de rata. La observación de que la activación de la adenilil ciclasa por odorantes era mediada por una proteína G, llevó a estos investigadores a la idea que los receptores a odorantes podrían pertenecer a la superfamilia de los así llamados receptores acoplados a proteína G. Empleando partidores derivados de varios receptores pertenecientes a esta superfamilia, ellos clonaron y caracterizaron 18 miembros diferentes de una familia multigénica que codifican proteínas con siete dominios transmembranales y cuya expresión está restringida al epitelio olfatorio. Más recientemente, mediante hibridización *in situ*, se demostró que la expresión de estos



receptores está localizada en el extremo apical del epitelio olfatorio [Ressler *et al.*, 1993; Vassar *et al.*, 1993]. Una familia más pequeña de genes (aproximadamente 100) que codifican para receptores a odorantes fue identificada en el pez gato [Ngai *et al.*, 1993a]. La expresión de estos genes daría como resultado uno o dos receptores diferentes por neurona y con una distribución al azar dentro del epitelio olfatorio [Ngai *et al.*, 1993b]. Estudios recientes realizados por Buck y colaboradores han determinado que, en la rata, un receptor olfatorio reconoce múltiples tipos de odorantes y que un odorante es reconocido por múltiples NOs diferentes, lo que argumenta a favor de la idea que los receptores en la olfacción serían en realidad “promiscuos” en la detección de las diversas entidades odoríferas [Malnic, *et al.*, 1999; Duchamp *et al.*, 2000].

Proteínas G. La participación de proteínas G como intermediarios en la transducción olfatoria fue sugerida inicialmente por Lancet y colaboradores (1986) sobre la base de evidencias bioquímicas obtenidas en preparaciones de cilios olfatorios de rana [Pace *et al.*, 1985]. Ellos encontraron que el aumento en la actividad de la enzima adenilil ciclasa inducida por odorantes en esta preparación dependía de GTP, sugiriendo la participación de una proteína G. La movilidad electroforética y la ADP-ribosilación catalizada por la toxina del cólera permitieron demostrar que esta proteína es semejante a la proteína G<sub>s</sub> encontrada en otros sistemas celulares [Pace *et al.*, 1985; Sklar *et al.*, 1986]. La secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\alpha$  de esta proteína mostró un 88% de identidad con la G<sub>s</sub> de otros sistemas, motivo por el cual se la clasificó como una forma diferente de otras proteínas G<sub>s</sub>. Más tarde se encontró que la expresión de esta proteína

está restringida al epitelio olfatorio [Jones y Reed, 1989], por lo que se la denominó  $G_{olf}$ . Por otro lado, se ha mostrado también la presencia de proteínas  $G_i$  y  $G_o$  en cilios olfatorios de rana [Pace *et al.*, 1985] y de pez gato [Bruch *et al.*, 1988]. Posteriormente, los registros de corrientes totales en neuronas olfatorias aisladas, realizados por Firestein y colaboradores (1991a), demostraron que el GTP- $\gamma$ -S (análogo del GTP resistente a la hidrólisis), agregado en la pipeta de "patch", prolonga la corriente de entrada inducida por odorantes, apoyando la hipótesis de que estas proteínas tienen un papel importante en el desarrollo de la respuesta de quimiotransducción. Recientemente, han sido generados ratones "knock-out" carentes de la proteína  $G_{olf}$  [Belluscio *et al.*, 1998]; los electroolfatogramas registrados en estos animales revelan la ausencia de respuesta a cualquiera de los odorantes probados, argumentando a favor de la participación de una vía enzimática dependiente de esta proteína, en la respuesta a odorantes.

**El AMPc, la conductancia catiónica activada por nucleótidos cíclicos y el inositol trisfosfato en las NOs.**

*El AMPc y la conductancia catiónica activada por nucleótidos cíclicos (CNGC).* Las primeras evidencias que permitieron proponer al AMPc como mensajero secundario en la olfacción fueron electrofisiológicas, de acuerdo a las cuales algunos análogos de este nucleótido, e inhibidores de la fosfodiesterasa (enzima que hidroliza el AMPc), alteraban el potencial inducido por odorantes en el epitelio olfatorio [Kurihara y Koyama, 1972; Menevse *et al.*, 1977]. Los registros de corriente en parches escindidos de la membrana de cilios olfatorios demostraron la presencia de una conductancia catiónica gatillada

directamente por nucleótidos cíclicos en NOs [Nakamura y Gold, 1987]. La perfusión de la cara interna del parche de membrana con AMPc o GMPc produjo un incremento rápido y reversible en la conductancia de la membrana. El potencial de inversión determinado para la corriente activada por nucleótidos cíclicos fue de aproximadamente 0 mV, semejante al potencial de inversión de la corriente excitatoria inducida por odorantes [Trotier y MacLeod, 1983; Nakamura y Gold, 1987]. La confirmación bioquímica de la participación del AMPc en la transducción olfatoria se obtuvo a mediados de los años 80, con el desarrollo de métodos para obtener fracciones enriquecidas en membranas derivadas de los cilios olfatorios [Rhein y Cagan, 1980; Anholt *et al.*, 1986]. Se encontró que un grupo importante de odorantes, entre los que se cuentan odorantes florales, frutales y herbáceos, estimulaba entre un 30 a 65% la formación de AMPc en la preparación de cilios olfatorios. Estos resultados llevaron a Lancet (1985) a proponer un modelo según el cual la quimiotransducción es mediada por una estimulación de la actividad de la adenilil ciclasa, la cual aumenta los niveles del mensajero secundario AMPc. La participación del AMPc en la transducción olfatoria se complementó con evidencias derivadas de estudios electrofisiológicos mediante la técnica de "patch-clamp". La aplicación externa de análogos de nucleótidos cíclicos permeables a la membrana incrementa la frecuencia de disparo de potenciales de acción [Frings y Lindemann, 1991]. Por otro lado, el 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, un inhibidor de la enzima fosfodiesterasa) agregado a la pipeta de registro prolonga la corriente de entrada inducida por odorantes en neuronas olfatorias aisladas [Firestein *et al.*, 1991a]. Firestein y colaboradores (1991b), registrando mediante la modalidad de

célula adherida a la pipeta y luego en parche escindido de neuronas olfatorias de salamandra, mostraron que el mismo canal era activado tanto por el estímulo odorífero como por la perfusión con nucleótidos cíclicos [Firestein *et al.*, 1991b; Zufall *et al.*, 1991a]. El gen que codifica para el canal activado por nucleótidos cíclicos de neuronas olfatorias de vertebrados ha sido clonado y expresado en oocitos de *Xenopus laevis*, conservándose las propiedades de conductancia, dependencia de voltaje y sensibilidad a nucleótidos cíclicos del canal nativo [Dhallan *et al.*, 1990; Ludwig *et al.*, 1990; Goulding *et al.*, 1992].

Inositol trisfosfato. En los estudios de Pace *et al.* (1986) y Sklar *et al.* (1986), se encontró también que otro grupo importante de odorantes (entre los que se encontraban odorantes pútridos, solventes orgánicos y algunos herbáceos), no indujo un aumento claro en la actividad de la adenilil ciclasa ciliar [Sklar *et al.*, 1986], sugiriendo la posible existencia de otra vía de transducción asociada a la detección de estos odorantes. Estudios en el pez *Ictalurus* (pez gato) mostraron que los odorantes (aminoácidos en el caso de los peces) que no activan la formación de AMPc, inducen una activación dependiente de GTP de la enzima fosfolipasa C, implicando a la formación de inositol-1,4,5-trisfosfato (InsP<sub>3</sub>) mediada por proteína G en la transducción olfativa [Huque y Bruch, 1986]. Estos resultados, obtenidos con técnicas bioquímicas convencionales, fueron corroborados y extendidos por estudios en que se usó el método de cinética rápida en preparaciones de cilios olfatorios aislados de rata y de pez gato. Estos estudios mostraron que ocurre un incremento rápido y transitorio de cAMP o InsP<sub>3</sub> en respuesta a

diferentes odorantes [Boekhoff *et al.*, 1990; Breer *et al.*, 1990, Restrepo *et al.*, 1993]. Un sistema de cultivo primario de NOs de mamíferos, desarrollado por Ronnett y colaboradores (1993), permitió a este grupo estudiar la activación de los sistemas de mensajeros secundarios en respuesta a odorantes en NOs intactas. Ellos observaron que todos los odorantes que utilizaron eran capaces de estimular la producción tanto de AMPc como de  $\text{InsP}_3$  [Ronnett *et al.*, 1993]. La participación del  $\text{InsP}_3$  en la quimiotransducción olfativa no ha sido aclarada hasta el momento. Más aún, en los últimos años las observaciones sobre la posible participación directa del  $\text{InsP}_3$  en la olfacción han caído en descrédito, y hoy es cada vez más aceptado que este mensajero secundario no sería indispensable para el desarrollo de la respuesta a olor [Chen *et al.*, 2000; esta Tesis].

Evidencias publicadas por Brunet y colaboradores [Brunet *et al.*, 1996], mostraron que ratones transgénicos que carecen del canal catiónico activado por AMPc son anósmicos y presentan electroolfatogramas que revelan la ausencia de respuesta frente a todos los odorantes estudiados, incluidos aquellos odorantes que supuestamente incrementan los niveles de  $\text{InsP}_3$  ciliar. La explicación que estos autores dan a sus resultados, es que en ratón el único mecanismo de detección de olores sería la vía del AMPc. Estos resultados están en contraposición con la existencia de otra vía de transducción en la olfacción de los vertebrados, aunque es posible que en mamíferos exista sólo una vía de transducción asociada a la detección de olores, y más de una en otros vertebrados. Otra posibilidad es que exista un efecto pleiotrópico de la mutación en este ratón "knock-out", que produzca la alteración de otras posibles vías de

transducción. Por otro lado, en los ratones “knock-out” de la enzima adenilil ciclasa [Wong *et al.*, 2000] y en los ratones “knock-out” carentes de la proteína  $G_{olf}$  [Belluscio *et al.*, 1998] los electroolfatogramas registrados revelan la ausencia de respuesta a todos los odorantes probados, argumentando a favor de la idea que la vía del AMPc es indispensable en el proceso olfatorio.

### **Respuesta excitatoria a odorantes.**

La primera evidencia directa de corrientes activadas por odorantes fue obtenida por Trotier (1986) en neuronas olfatorias aisladas de salamandra. Al estimular estas células con concentraciones micromolares de una mezcla de los odorantes isoamilacetato y butanol, éstas respondieron con una corriente de receptor excitatorio cuya curva I-V fue lineal en el rango  $\pm 100$  mV, invirtiendo a un potencial cercano a 0 mV; esto es consistente con una conductancia selectiva a cationes. Estudios posteriores realizados en neuronas olfatorias aisladas de diferentes vertebrados, en condiciones de potencial controlado, han demostrado que la corriente de entrada inducida por pulsos cortos de odorantes (50 - 1000 ms) que activan la adenilil ciclasa comienza a desarrollarse 150-1000 ms después de la aplicación del estímulo. Esta corriente alcanza un valor máximo en aproximadamente 50 ms, para luego decaer a niveles basales con una constante de tiempo de  $\sim 1$  s [Firestein y Werblin, 1989; Firestein *et al.*, 1990].

Así, hasta ahora la vía de quimiotransducción olfativa mejor caracterizada en vertebrados es la vía excitatoria, donde un incremento en los niveles de AMPc en respuesta a odorantes causa la activación de una conductancia catiónica ciliar

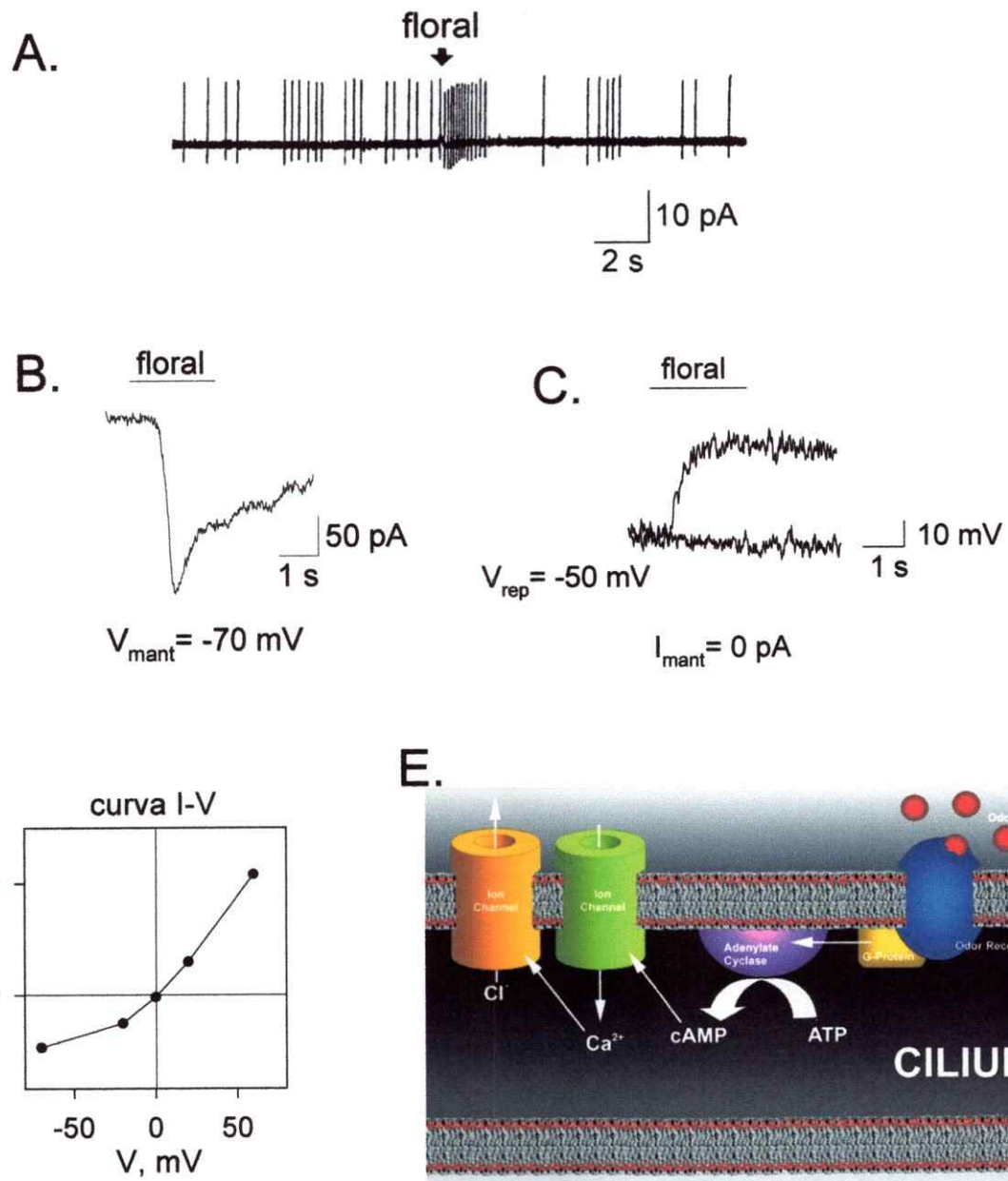


Figura 5

**Figura 5. La respuesta excitatoria a odorantes.** A. Registro en configuración de célula adherida a la pipeta, donde se observa el incremento en la frecuencia de descarga de potenciales de acción (expresadas aquí como corrientes de acción) de la neurona frente al estímulo con una mezcla de odorantes florales y frutales. B. Corriente de entrada inducida por estos odorantes a un potencial de mantención cercano al potencial de reposo de la célula. C. Desarrollo del potencial de receptor despolarizante en respuesta a la estimulación con estos odorantes. D. Relación corriente versus voltaje (curva I-V) de la corriente excitatoria. E. Modelo del mecanismo molecular involucrado en la respuesta excitatoria.



pobremente selectiva (la CNGC), por acción directa del mensajero secundario sobre el canal. La activación de esta conductancia induce el desarrollo de un potencial de receptor despolarizante (Figura 5C), el que es responsable de un aumento transitorio en la frecuencia de descarga de potenciales de acción de la neurona receptora (Figura 5A). La diálisis de AMPc al interior de la neurona olfatoria a través de la pipeta de "patch" genera una corriente de entrada con las mismas características de la corriente activada por odorantes que inducen excitación [Kurahashi, 1990; Firestein *et al.*, 1991a]. La corriente de entrada gatillada por nucleótidos cíclicos es portada principalmente por iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  [revisado por Zufall *et al.*, 1994], por lo que el canal catiónico activado por AMPc permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula [PCa/PNa= 6.5, según Kurahashi y Shibuya, 1990]. La actividad de este canal es regulada también por  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto intra como extracelularmente [Nakamura y Gold, 1987; Firestein *et al.*, 1990; Kurahashi, 1990; Kramer y Siegelbaum, 1992; Zufall *et al.*, 1991b, 1994; Frings *et al.*, 1995]. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por la activación de esta conductancia induce un incremento en la concentración intraciliar de este catión, el que a su vez activa una conductancia de  $\text{Cl}^-$  [Kleene y Gesteland, 1991] que amplifica la corriente de transducción excitatoria [Lowe y Gold, 1993] (Figura 5E). Esta última conductancia contribuye en gran medida al potencial de receptor despolarizante [Kurahashi y Yau, 1993] y es la responsable de una parte importante de la corriente excitatoria en *Caudiverbera* (Figura 10C, izquierda), como lo muestra el bloqueo por DIDS y ácido niflúmico (bloqueadores de canales de  $\text{Cl}^-$ ) de gran parte de la corriente excitatoria en esta especie.

### **Supresión por odorantes.**

Se ha demostrado que la exposición sostenida de las neuronas olfatorias aisladas a odorantes en la solución del baño bloquea las corrientes dependientes de potencial en estas células [Kawai *et al.*, 1997]. Este efecto se manifestó como una reducción tanto de las corrientes de entrada como de las de salida gatilladas por pulsos de voltaje despolarizante aplicados en presencia de odorantes. Se ha demostrado también que pulsos de odorantes suprimen las corrientes de transducción, fenómeno que ocurre con una latencia muy breve ( $\sim 20$  ms) [Kurahashi *et al.*, 1994]. Recientemente se mostró que pulsos breves de odorantes pueden también suprimir, aparentemente de manera directa, a las corrientes dependientes de potencial en las NOs [Sanhueza y Bacigalupo, 1999], las que se localizan en la membrana plasmática del soma celular. Este último trabajo, junto con el de Kawai y colaboradores (1997), mostró además que la supresión y la transducción tienen lugar en rangos semejantes de concentración de odorantes, lo que indica que la supresión podría influenciar las respuestas a olor al menos en la neurona olfatoria aislada y que este es un fenómeno que debe considerarse al estudiar respuestas a odorantes en estas células.

### **Respuesta inhibitoria a odorantes.**

La respuesta inhibitoria a odorantes consiste en la disminución transitoria de la frecuencia de descarga de potenciales de acción de la neurona frente a un estímulo odorífero (Figura 6A). Los eventos moleculares asociados a la respuesta inhibitoria en vertebrados, en contraste con los asociados a la respuesta excitatoria, eran muy poco conocidos hasta ahora. Las primeras aproximaciones a esta interrogante provinieron del

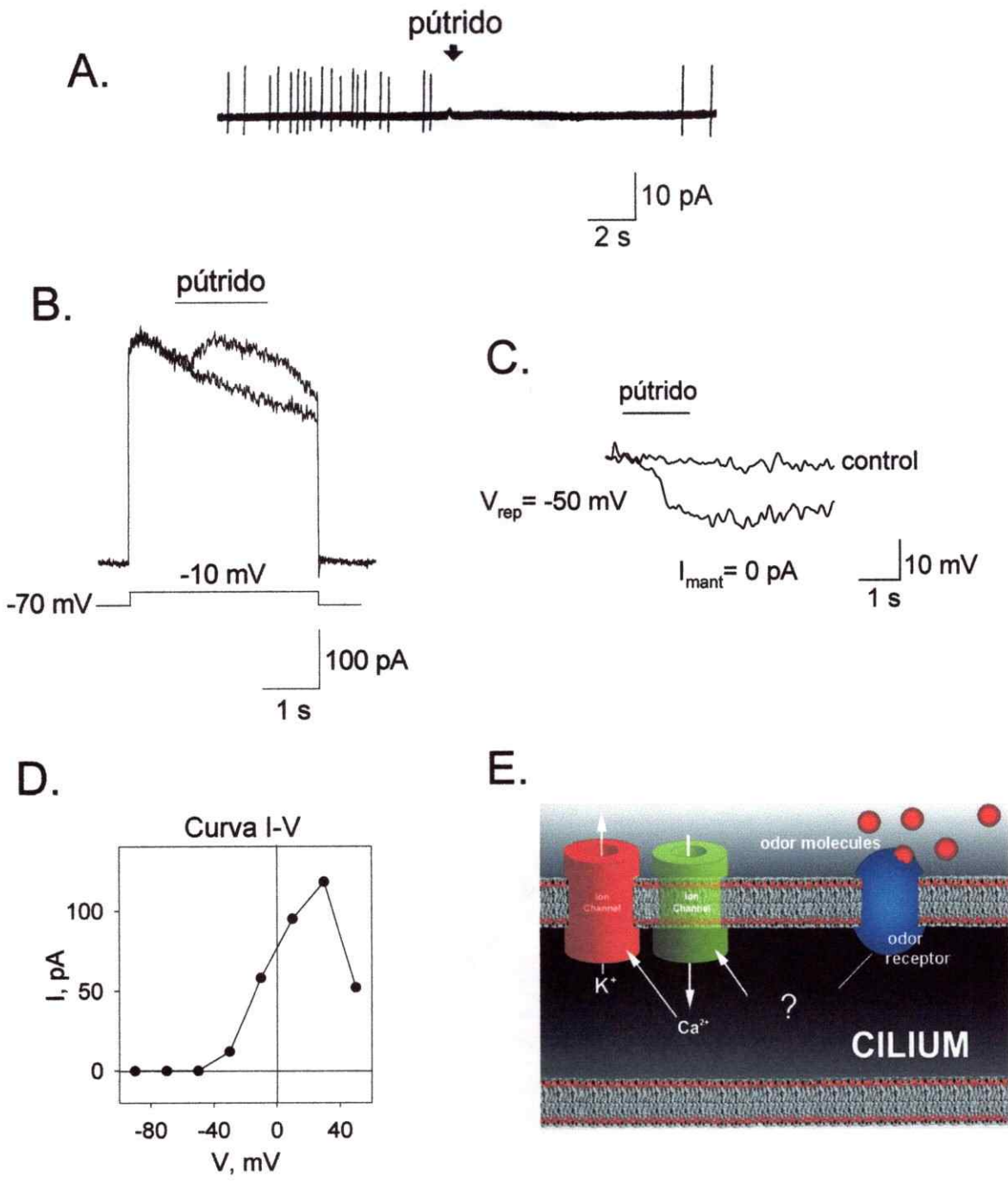


Figura 6

**Figura 6. La respuesta inhibitoria a odorantes.** Registro en configuración de célula adherida a la pipeta, donde se observa una disminución en la frecuencia de descarga de potenciales de acción de la neurona (medidos como corrientes de acción) frente al estímulo con una mezcla de odorantes pútridos. B. Corriente de salida inducida por el estímulo odorífero. En esta célula el potencial de membrana fue fijado a un valor fuertemente despolarizante (-10 mV) con el propósito de aumentar la fuerza impulsora para el ion  $K^+$ , portador de la corriente inhibitoria en estas células. C. Potencial de receptor hiperpolarizante inducido por odorantes pútridos. D. Curva I-V de la corriente inhibitoria. E. Modelo de la maquinaria molecular involucrada en la respuesta inhibitoria propuesto antes del inicio de esta Tesis.

trabajo de Dionne (1992), en NOs del salamántrico *Necturus*. En este estudio, se encontró que una mezcla de aminoácidos con efecto inhibitorio inducía una hiperpolarización de las células olfatorias, sin que se definiera qué conductancia era responsable de esta respuesta. De igual modo, se demostró que el potencial de receptor hiperpolarizante inducido por ciertos odorantes en la langosta marina es el resultado de la activación por cAMP de una conductancia de  $K^+$  que causa una disminución transitoria de la actividad eléctrica de la neurona [Michel y Ache, 1992; Ache, 1994]. Otros estudios realizados en neuronas receptoras de la langosta marina mostraron que, en invertebrados, el desarrollo del potencial de receptor despolarizante responsable del aumento transitorio en la descarga de potenciales de acción de la neurona (respuesta excitatoria), es resultado de la activación por  $InsP_3$  de una conductancia de  $Ca^{2+}$  [Ache, 1994; Boekhoff *et al.*, 1994], localizada en la región de transducción de la célula receptora.

Estudios realizados por Morales y colaboradores demuestran que la inhibición en NOs del sapo *Caudiverbera caudiverbera*, inducida por una mezcla equimolar de los odorantes pútridos trietilamina, ácido isovalérico y pirazina, se debe al desarrollo de un potencial de receptor hiperpolarizante (Figura 6C) generado por la activación de una conductancia apical de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  (Figura 6B), sensible a CTx [Morales *et al.*, 1994, 1995]. Estudios electrofisiológicos en preparaciones de membrana de cilios olfatorios sugieren que este canal estaría presente en la membrana de estos orgánulos en *C. caudiverbera* [Jorquera *et al.*, 1995]. Recientemente se ha logrado registrar directamente los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  en parches de membrana de cilios

olfatorios de NOs de *Caudiverbera* y rata [Delgado *et al.*, Abstract AChemS, 2001], resultados que corroboran la presencia de estos canales en los cilios de las NOs. La gran facilidad con la que se obtienen neuronas olfatorias intactas por disociación mecánica de su epitelio olfatorio, el tamaño de las mismas, el carácter ectotermo de los anfibios y la alta frecuencia de disparo espontáneo de potenciales de acción hacen de *Caudiverbera caudiverbera* un modelo experimental adecuado para estudiar respuestas a odorantes en NOs aisladas.

Las corrientes inhibitorias activadas por odorantes han sido descritas también en otros anuros como el sapo africano *Xenopus leavis* [Morales *et al.*, 1994] e incluso en la rata [Sanhueza *et al.*, 2000]. Tanto el mensajero secundario involucrado en la activación de la respuesta inhibitoria, como los blancos moleculares directos de su acción, no habían sido claramente definidos hasta ahora (Figura 6E). Nosotros, utilizando diversas herramientas farmacológicas, liberación controlada de mensajeros secundarios enjaulados y protocolos de estimulación con diferentes clases de odorantes, obtuvimos las evidencias que nos permiten proponer el primer modelo que da cuenta del mecanismo inhibitorio en neuronas olfatorias de vertebrados.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

*El mecanismo de transducción asociado a la respuesta inhibitoria inducida por odorantes en NOs de sapo involucra la participación de una conductancia de  $Ca^{2+}$  ciliar cuya activación sería mediada por una vía de mensajeros secundarios. Esta conductancia podría corresponder a la conductancia catiónica no selectiva activada por AMPc y sería por lo tanto activada a través de la vía de transducción asociada a la respuesta excitatoria.*

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Determinar la identidad, propiedades y localización de la vía de entrada de  $Ca^{2+}$  asociada a la respuesta inhibitoria en *Caudiverbera caudiverbera*.
- ii) Establecer cuál es el mensajero secundario que la activa.
- iii) Demostrar la relación entre el aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  libre en respuesta a odorantes pútridos y la activación de la conductancia de  $K^+$  inhibitoria.

## MÉTODOS

### Preparación, soluciones y cambios de soluciones.

Las neuronas olfatorias (NOs) aisladas fueron obtenidas por disociación mecánica del epitelio olfatorio del sapo chileno *Caudiverbera caudiverbera*. Los animales fueron anestesiados en hielo por 20 minutos, sacrificados por decapitación y el epitelio fue removido de las cavidades nasales bajo lupa por medio de tijeras y pinzas finas. El epitelio olfatorio, cortado en trozos de 1-2 mm<sup>2</sup>, fue mantenido en solución Ringer hipertónico (en mM: 120 NaCl, 3 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 5 glucosa, 5 piruvato de sodio; pH 7.6), suplementado con un antibiótico (penicilina G, 100 u.i./ml), aminoácidos (L-glutamina, 80 µg/ml; L-leucina, 14 µg/ml) y albúmina (10% P/V).

La composición de las soluciones usadas en este estudio fue la siguiente (mM):

Ringer Normal: 115 NaCl, 2.5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 0.4 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 3 glucosa, pH 7.6.

Solución Interna Normal: 120 KCl, 2 EGTA, 4 HEPES, 0.1 Na-GTP, 1 Mg-ATP, 1 CaCl<sub>2</sub>; pCa 8; pH 7.6.

Solución interna para Ca<sup>2+</sup> enjaulado: 120 KCl, 4 HEPES, 0.1 Na-GTP, 1 Mg-ATP, 2 CaCl<sub>2</sub>, 4 DM-Nitrofenol; pH 7.6.

El intercambio rápido de la solución que baña a la célula de la cual se registra, fue llevado a cabo con una pipeta multicañón (Sutter Instrument Co.) ubicada a ~30 µm de



la célula y confeccionada en un estirador vertical (modelo 700C, David Kopf Instruments). El diámetro de la punta de cada cañón fue de 5 a 10  $\mu\text{m}$ . El flujo de la solución desde los cañones fue controlado por un "picospritzer", manejado por un computador. En los experimentos donde se utilizaron odorantes, el diámetro de la punta de cada cañón de la pipeta de estímulo fue de  $\sim 1 \mu\text{m}$  o menor, y el estímulo fue dirigido a los cilios olfatorios o al cuerpo celular, según se indica.

### **Registros eléctricos, detección de señales de calcio y análisis de datos.**

Las corrientes de célula completa ("whole-cell") fueron registradas bajo voltaje controlado ("V-clamp"). La actividad eléctrica (potenciales de acción) de las NOs fue registrada bajo corriente controlada ("I-clamp") también en configuración de célula completa. La capacidad de la membrana ( $C_m$ ) y la resistencia en serie ( $R_{\text{serie}}$ ) fueron canceladas apropiadamente; las células donde la  $R_{\text{serie}}$  superó los 20  $\text{M}\Omega$  fueron descartadas. En este trabajo se utilizó un Axopatch ID en los registros eléctricos, el programa pCLAMP5.5.2 (Axon Instruments) para la adquisición de datos, y los programas pCLAMP6 (Axon Instruments) y Sigmaplot 2.0 (Jandel Corporation) para el análisis de los datos. Las pipetas de "patch" fueron confeccionadas con vidrio capilar para microhematocrito (Globe Scientific Inc.), utilizando un estirador horizontal (modelo P-97, Sutter Instrument Co.). La resistencia de los electrodos fue 2 - 4  $\text{M}\Omega$ .

Un microscopio confocal (Zeiss, Axiovert 135M), implementado con un objetivo 60X de inmersión en aceite, con apertura numérica de 1.3, fue utilizado para la obtención de las imágenes de  $\text{Ca}^{2+}$  ciliares. En estos experimentos, las células fueron

incubadas por 20-40 minutos en Ringer suplementado con 18  $\mu\text{M}$  del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-3, AM (Molecular Probes, Inc.), y enjuagadas una vez antes de ser usadas. El Fluo-3, AM fue disuelto en una solución de ácido plurónico F-127 (Molecular Probes, Inc.) al 20 % en DMSO, hasta una concentración de 1.38 mM. La mezcla fue agregada al Ringer Normal hasta lograr la concentración final deseada de indicador. Las células fueron fijadas al fondo de la cámara de estudio utilizando 0.1% polilisina y 0.01% laminina según Leinders-Zufall *et al.* (1997). Alternativamente se usó una solución de pegotina al 1% (Bioschile), la cual se agrega la noche anterior sobre la cámara de registro y se enjuaga (un volumen) al día siguiente con agua bidestilada antes de agregar las células. En algunos experimentos, la fijación de los cilios se complementó con la marcación de éstos (y de toda la membrana plasmática de la NO) con DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetrametil lindocarbocianina perclorado, de Molecular Probes Inc.) como marcador de lípidos. De este modo la posición del cilio olfatorio puede ser seguida durante la estimulación con odorantes, permitiéndonos descartar los cambios de fluorescencia ciliar que pudieran corresponder a un cambio de posición del orgánulo durante la estimulación. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando los programas LSM dummy (Zeiss) y NIH Image 1.59. La estimulación con odorantes se realizó, al igual que en los experimentos electrofisiológicos, con una pipeta multicañón controlada por un micromanipulador, y el flujo de las soluciones de estímulo se controló por un "pico-spritzer".

En los experimentos en los que se registró los cambios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por despolarización, la pipeta de registro fue llenada con con solución interna

normal a la que se agregó 20  $\mu\text{M}$  de Fluo 3 (Molecular Probes Inc.) (Figura 23A) o solución interna conteniendo: 120 mM KCl, 50  $\mu\text{M}$  EGTA (sin  $\text{Ca}^{2+}$  agregado), 4 mM HEPES, 0.1 mM Na-GTP, 1 mM Mg-ATP, pH 7.6, suplementado con 50  $\mu\text{M}$  del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  Fura-2 (Molecular Probes Inc.) (Figura 23C, panel superior). En ambos casos la señal de fluorescencia fue adquirida utilizando la Interfase del Sistema de Fluorescencia de IonOptix Corporation y analizada con el programa IonWizard 4.2 (IonOptix Corp.).

### **Mensajeros secundarios enjaulados y bloqueadores.**

Los experimentos utilizando liberación de AMPc y  $\text{Ca}^{2+}$  desde sus respectivos compuestos enjaulados, se llevaron a cabo usando una lámpara de Xenón de 75 W como fuente de luz ultravioleta (UV). Los pulsos de luz UV fueron controlados por computador con el programa IonWizard 4.2, utilizando la Interfase del Sistema de Fluorescencia de IonOptix Corporation.

El AMPc enjaulado (4,5-dimetoxi-2-nitrobenzil adenosin 3',5'-monofosfato cíclico, de Molecular Probes, Inc.) se agregó directamente a la solución interna normal y fue utilizado a una concentración final de 100 a 500  $\mu\text{M}$  según se indica, a partir de una solución fuente 100 mM en DMSO. Para lograr un incremento gradual del AMPc se utilizó una concentración baja del compuesto enjaulado (100 - 200  $\mu\text{M}$ ) y pulsos largos (1 - 3 s) de luz UV. Para lograr incrementos abruptos del nucleótido se utilizaron concentraciones altas del compuesto enjaulado (250 - 500  $\mu\text{M}$ ) y pulsos breves de luz UV (10 - 500 ms).

El InsP<sub>3</sub> enjaulado (D-*mio*-inositol 1,4,5-trifosfato, P<sub>4(5)</sub>-(1-(2-nitrofenil)etil)ester, sal trisódica, de Molecular Probes, Inc.) fue preparado directamente en solución interna normal a una concentración de 150 µM y fue liberado por pulsos prolongados sucesivos de luz UV de 10 a 20 segundos cada uno.

El Ca<sup>2+</sup> enjaulado fue preparado como sigue: 500 µl de solución interna conteniendo 2 mM CaCl<sub>2</sub> fueron agregados a un vial de 500 µg de DM-Nitrofenol (1-(2-Nitro-4,5-dimetoxifenil)-1,2-diaminoetano-N,N,N',N'-ácido tetraacético, de Calbiochem - Novabiochem Corporation). Cada vial resultante contenía 500 µl de solución interna con Ca<sup>2+</sup> quelado por el DM-Nitrofenol; este compuesto liberará Ca<sup>2+</sup> de manera reversible cada vez que se le ilumina con luz UV. La solución preparada de esta manera fue utilizada inmediatamente. La concentración estimada de Ca<sup>2+</sup> libre final después del estímulo de luz UV, es de decenas de µM, comenzando de un valor basal de Ca<sup>2+</sup> libre del orden de nM. Todas las soluciones que contienen compuestos enjaulados fueron protegidos de la luz directa, y filtradas a través de un filtro miliporo (0.2 µm) (Nalgene) antes de su uso.

El LY83583 (6-(fenilamino) 5,8-quinolinodina, de Research Biochemical International, RBI) fue preparado en DMSO hasta una concentración de 20 mM y conservado como solución fuente congelada a -20 °C. La droga fue aplicada en concentraciones que iban desde los 2 a los 20 µM, según se indica. El SQ22536 (9-(tetrahidro-2'-furyl)adenina, de Calbiochem-Novabiochem Corporation) fue preparado en agua bidestilada como una solución fuente 100 mM y fue utilizado a una concentración final de 100 µM. En los experimentos con taspigarguina, ésta se usó a

una concentración final de 1  $\mu\text{M}$  en la solución interna ó 2  $\mu\text{M}$  en el medio externo, a partir de una solución fuente 1 mM en acetona conservada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El DIDS fue utilizado a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ ; éste fue preparado en Ringer a partir de una solución fuente 10 mM en agua bidestilada. El ácido niflúmico se usó a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  y fue preparado en Ringer a partir de una solución fuente 10 mM en etanol.

CTx (caribdotoxina) e IbTx (iberiotoxina) (Alomone Labs.) se prepararon como soluciones fuente en agua bidestilada (12  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  respectivamente). Ambas toxinas fueron utilizadas a una concentración final de 20 nM.

### **Odorantes.**

Los odorantes utilizados en este estudio fueron:

Odorantes pútridos: ácido isovalérico (ácido 3-metilbutanoico), trietilamina, pirazina (1,4-diazina) y cadaverina (1,5-diaminopentano). Los tres primeros odorantes mencionados fueron mezclados en cantidades equimolares para formar la mezcla P. La cadaverina fue utilizada por separado.

Odorantes florales / frutales: Geraniol (3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol), citralva (3,7-dimetil-2,6-octdienenitrilo, gentilmente facilitado por Diego Restrepo) y citronelal (3,7-dimetil-6-octenal). Estos tres odorantes, en cantidad equimolar, conformaron la mezcla floral-frutal o mezcla F.

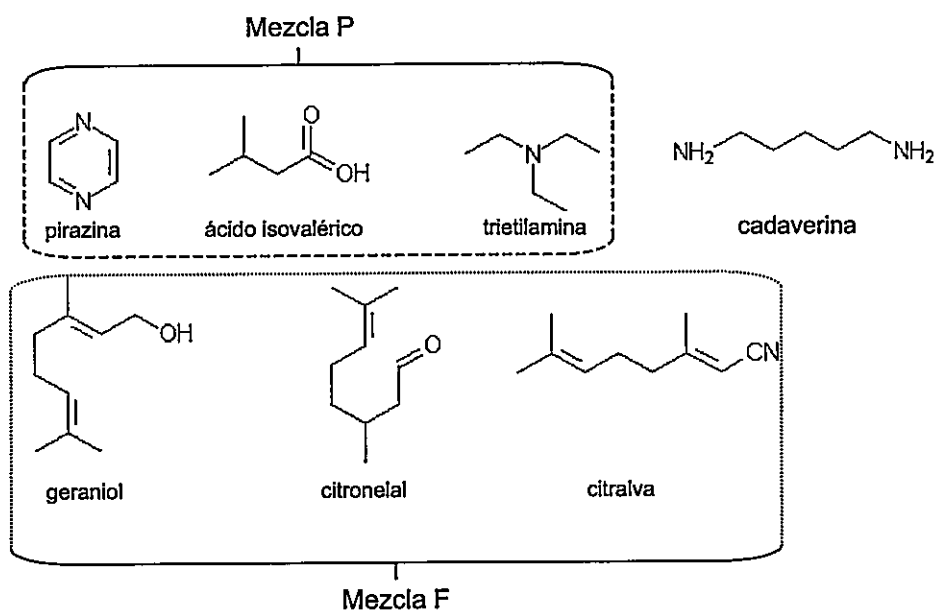
La estructura de estos odorantes se muestra en la figura 7.

Otros odorantes utilizados fueron: Liral (4-(4-hidroxi-4metilpentil)-3-ciclohexano-1-carboxialdehído) y lilial (4-(1,1-dimetiletil)- $\alpha$ -metilbenzenopropanol).

La concentración de odorantes en las inmediaciones de la célula fue determinada según Firestein y Werblin (1989).

En el caso de las corrientes inhibitorias, éstas fueron estudiadas a potenciales despolarizantes, con el fin de aumentar la fuerza impulsora para el ion  $K^+$  portador de la corriente.

Todos los reactivos fueron de Sigma (Sigma Co.) excepto donde se indica una fuente distinta.



**Figura 7. Estructura química de los principales odorantes utilizados.** En la figura se puede observar la estructura de los odorantes pútridos (mezcla P y cadaverina) y los odorantes florales/frutales (mezcla F) usados en esta Tesis.

## RESULTADOS

### Los odorantes pútridos activan la CNGC.

Como ha sido demostrado anteriormente, la inhibición de la actividad eléctrica en una NO depende de la activación de una conductancia de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$ . Esta conductancia a su vez depende de la activación de una conductancia de  $Ca^{2+}$ , cuya identidad y propiedades desconocíamos. En los primeros estudios de las respuestas inhibitorias fueron utilizados los odorantes pútridos; sin embargo, recientemente se mostró que una corriente de  $K^+$  de características similares a la corriente inhibitoria puede ser también activada por odorantes de la mezcla floral y frutal (mezcla F) [Sanhueza *et al.*, 2000], a través de un mecanismo desconocido. La primera evidencia que me dio un indicio acerca de la identidad de la conductancia de  $Ca^{2+}$  que participa en la inhibición, provino de la observación que los odorantes pútridos trietilamina, ácido isovalérico y pirazina (mezcla P), que activan la corriente de  $K^+$  inhibitoria, podían inducir además la activación de una prominente “corriente de cola” de entrada (Figura 8, panel derecho). Esto ocurrió en el 33% de las células estimuladas (n= 12) independientemente de una activación evidente de la corriente de  $K^+$  inhibitoria. La corriente de cola observada es el resultado del flujo de iones a través de los canales que están abiertos al término del pulso de voltaje despolarizante. Esta corriente de cola es similar a la observada en respuesta a odorantes de la mezcla F bajo

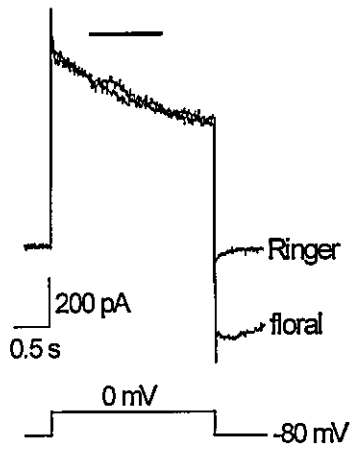


el mismo protocolo experimental (Figura 8, panel izquierdo) y es, en este caso, el resultado del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  a través de los canales activados por AMPc y del flujo de  $\text{Cl}^-$  a través de los canales de cloruro dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , que se activan en la respuesta excitatoria. En el panel central de la figura 8 se muestra corriente de salida sostenida por sobre el trazo control en respuesta al estímulo con odorantes pútridos y que, en este caso, va acompañada de una corriente de cola de entrada de menor magnitud que en el control. Esto es probablemente debido a que a  $-80$  mV (potencial al que se vuelve después del estímulo despolarizante) un aumento en la corriente de  $\text{K}^+$  por odorantes podría traducirse en un corriente de cola de salida mayor que en el control y que se anula en alguna medida con la de entrada. La corriente de cola de entrada en el trazo control corresponde a la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de potencial, cuya magnitud varía de célula en célula pero generalmente no es mayor a unas pocas decenas de pA. Esta pequeña corriente de cola se observa normalmente en los trazos control y por su magnitud no representa un problema para el análisis. Todos estos experimentos se realizaron al potencial de inversión de la corriente excitatoria, que es aproximadamente de  $0$  mV.

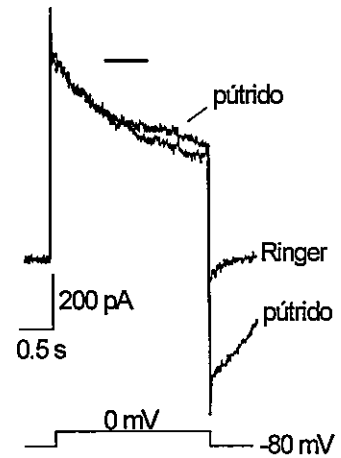
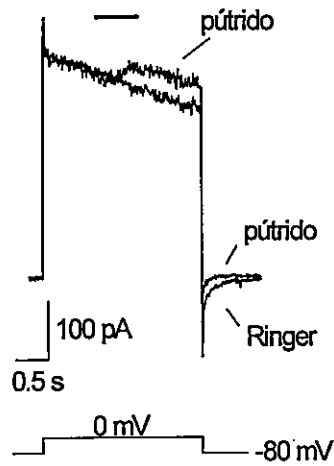
La presencia de corrientes de cola en la estimulación por odorantes de la mezcla P nos hizo pensar en la posibilidad que éstas fueran reflejo de la activación de la conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  involucrada en la inhibición. La estrategia que seguimos fue ver si podíamos descartar a la conductancia catiónica no selectiva activada por nucleótidos cíclicos (CNGC) como la responsable de esta corriente de cola. Con este fin, utilizamos herramientas farmacológicas para estudiar estas corrientes de cola; tanto el bloqueador de la CNGC, LY83583 ( $2 - 20 \mu\text{M}$ ) (Figura 8B), el inhibidor de la adenilil ciclasa, SQ22536

A.

Corrientes de cola en la respuesta excitatoria



Corrientes de cola en la respuesta inhibitoria



B.

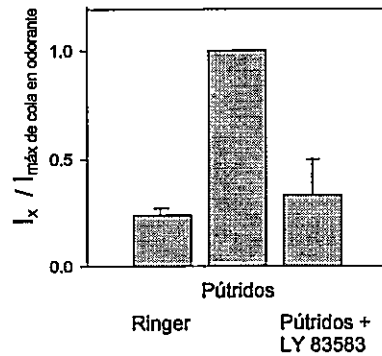


Figura 8

**Figura 8. Corrientes de cola en respuesta a odorantes pútridos.** A. La corriente de salida de  $K^+$  activada por odorantes pútridos (panel central) es en algunos casos (~33%, n= 12) acompañada por una prominente corriente de cola (panel derecho) semejante a la observada en la respuesta excitatoria gatillada por la mezcla F (panel izquierdo) y que es reflejo de la activación de la CNGC y de la conductancia de  $Cl^-$  dependiente de  $Ca^{2+}$  involucradas en la respuesta excitatoria. B. La corriente de cola activada por la mezcla P fue fuertemente reducida en presencia de 2  $\mu M$  LY83583, un bloqueador de la CNGC. La corriente de cola fue medida en el máximo; los resultados se representan normalizados a la corriente de cola máxima obtenida en presencia de odorante (n= 4).

(100  $\mu\text{M}$ ), y el bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  neuronales tipo L, calcicludina (10 nM) (no mostrados), afectaron considerablemente la activación de esta corriente de cola por odorantes pútridos [Madrid y Bacigalupo, 2000] (en la Figura 8B se muestra para LY83583) o por la mezcla F (no mostrado). Esto ocurrió en la totalidad de las células examinadas ( $n=7$ ), apoyando la posibilidad que la corriente de cola activada por odorantes pútridos depende de la CNGC. De ser cierta esta posibilidad, estos resultados sugerirían que la misma conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  participaría en ambos procesos, inhibitorio y excitatorio, y que éstos podrían compartir algunos de los pasos iniciales del mecanismo de transducción. Esta evidencia inicial fue apoyada y complementada por las observaciones que se detallan a continuación.

#### **Incrementos intraciliares de $\text{Ca}^{2+}$ inducidos por odorantes pútridos.**

Entre las evidencias publicadas por nuestro grupo hace algunos años [Morales *et al.*, 1997], mostramos que la estimulación con odorantes pútridos generaba un incremento apical de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, sin determinarse en ese momento si esos incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  llegaban a ocurrir en los cilios olfatorios, la estructura celular que concentra la maquinaria de quimiotransducción en la NO. Utilizando la estrategia de pegar los cilios olfatorios al fondo de la cámara de experimentación, e incrementando la concentración del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizado [Leinders-Zufall, 1997], logré resolver los cambios de fluorescencia en cilios olfatorios que no pudimos resolver en nuestro trabajo anterior [Morales *et al.*, 1997], y estudiar en ellos la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  durante la respuesta a odorantes pútridos.

Observé que estos odorantes gatillaron una elevación transitoria en la concentración intraciliar de  $\text{Ca}^{2+}$  en 4 de 19 NOs (Figura 9A). Las células utilizadas en estos experimentos fueron cargadas con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-3, AM (18  $\mu\text{M}$ ) y los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron seguidos mediante microscopía confocal.

Para la célula mostrada en la figura 9, las muestras de fluorescencia fueron tomadas cada 700 ms y un estímulo odorífero de 3 s fue dirigido sobre los cilios olfatorios. En la figura 9A se presentan la imagen de transmisión de la NO (izquierda) y dos de estas muestras: una previa (a) y una durante (b) el estímulo con odorantes. Con el fin de estimar los cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  ciliar durante los experimentos, la señal de fluorescencia obtenida bajo estimulación con odorantes fue comparada con la fluorescencia basal. Para esto, una alternativa es elegir una región de la célula (en el caso de la figura 9 la zona elegida corresponde al recuadro punteado en 9A) y confeccionar una gráfica como la mostrada en la figura 9B. Este perfil de fluorescencia normalizada muestra que, en la zona fijada por nosotros y que contiene una parte del cilio y del soma de la NO, la fluorescencia presenta un fuerte incremento en la región correspondiente al cilio y uno menor en el soma, en el máximo de la respuesta (b). Si tomamos la señal del cilio completo y la comparamos con la fluorescencia basal en todas las muestras, podemos determinar una razón de intensidades y confeccionar una gráfica de cambio de intensidad de fluorescencia en el tiempo, como la que se muestra en la figura 9C. Si comparamos las células que presentaron respuesta, la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  observada decreció con una constante de tiempo de  $5.1 \pm 2.3$  s ( $n= 3$ ). Este decrecimiento es similar al determinado para los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  intraciliar, medidos por otros autores en respuesta a odorantes florales / frutales [Leinders -

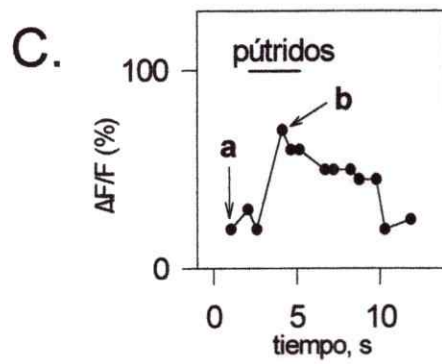
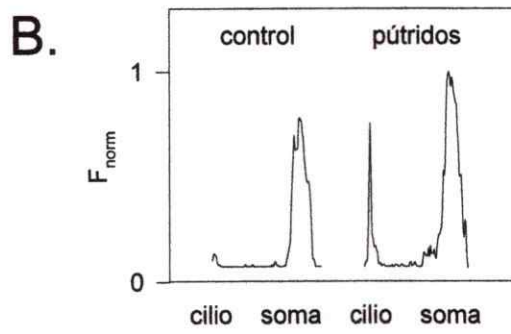
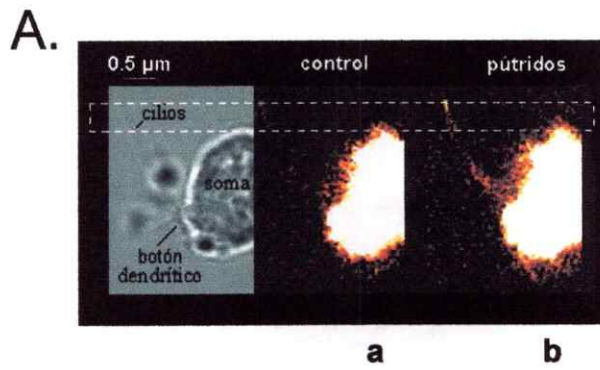


Figura 9

**Figura 9. Incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  intraciliar inducidos por odorantes pútridos.** A. La misma mezcla de odorantes pútridos, que induce respuestas inhibitorias en neuronas olfatorias bajo voltaje o corriente controlados, genera incrementos en la concentración intraciliar de  $\text{Ca}^{2+}$ . La célula de la figura fue cargada con 18  $\mu\text{M}$  Fluo-3, AM, como indicador de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cada panel en la figura A corresponde a un recuadro de  $\sim 30 \mu\text{m}^2$  acotando a la célula. El panel izquierdo muestra una imagen de transmisión de la neurona; a y b son las imágenes de fluorescencia antes (a) y en el máximo (b) de la respuesta a odorantes. B. Perfil de incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en un cilio olfatorio (y el soma) obtenido de la zona punteada de las muestras a y b en la parte A. C. Gráfico del curso temporal del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intraciliar en la misma NO.

Zufall *et al.*, 1997-1998]. Nuestros resultados indican que durante un estímulo con odorantes pútridos se produce un incremento en los niveles intraciliarios de  $\text{Ca}^{2+}$ ; este incremento sigue un curso temporal semejante al observado por otros autores cuando bajo estimulación con odorantes del tipo floral/frutal, y argumentan a favor de la idea que el  $\text{Ca}^{2+}$  que pasa a través del canal CNG es mediador de la respuesta a odorantes en el cilio de la NO, tanto en la inhibición como en la excitación.

### **La herramienta de los mensajeros secundarios enjaulados.**

Las evidencias recopiladas hasta este punto de la Tesis me sugerían la posibilidad de que la transducción inhibitoria fuese mediada por al menos dos mensajeros intracelulares: el  $\text{Ca}^{2+}$ , que aumenta en respuesta a odorantes pútridos y que es indispensable para el desarrollo de la corriente de  $\text{K}^+$  inhibitoria, y el putativo mensajero que activaría a la conductancia de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria para la activación de la conductancia de  $\text{K}^+$ . Con el fin de demostrar directamente que los incrementos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  culminan con la activación de las conductancias de transducción que dependen de este catión, y con la idea de determinar si AMPc (el mensajero secundario de la excitación) participa en la activación de la conductancia inhibitoria, utilicé la estrategia de generar aumentos controlados de los niveles de los mensajeros secundarios  $\text{Ca}^{2+}$  o AMPc al interior de la célula. Esto se llevó a cabo mediante la liberación de estos mensajeros desde sus respectivos compuestos jaula mediante luz UV. Esta estrategia involucra cargar a la NO con el mensajero secundario enjaulado a través de la pipeta de "patch" y luego liberarlo a través de un pulso de luz UV.



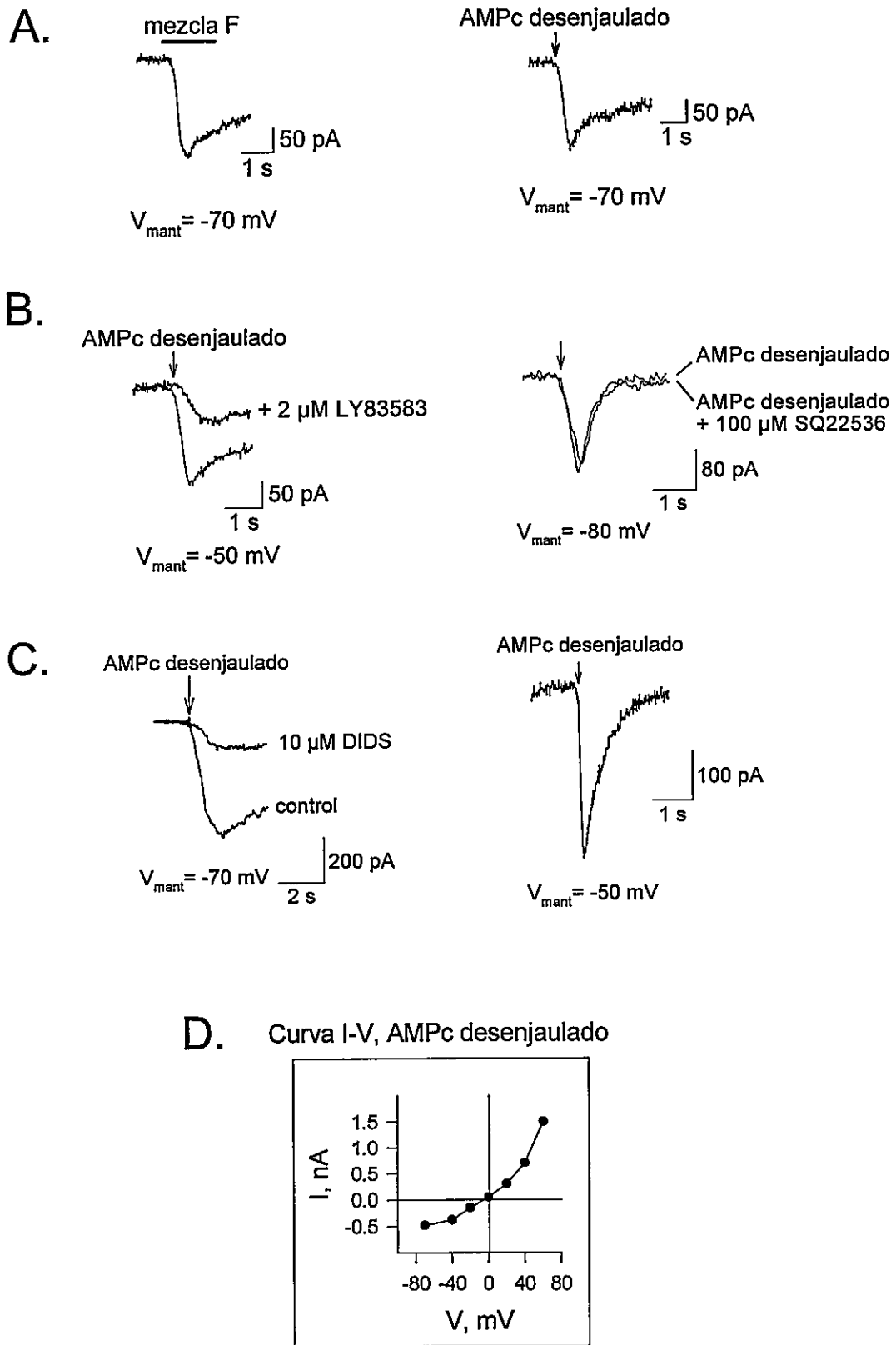


Figura 10

**Figura 10. Efecto de la liberación de AMPc desde el compuesto enjaulado en NOs.** A. Corriente inducida por un pulso de odorantes de la mezcla F, mostrando la típica corriente de transducción excitatoria en una NO cuyo potencial de membrana fue fijado a -70 mV. En el panel derecho, otra NO, esta vez cargada con AMPc enjaulado, al ser estimulada por un pulso de luz UV desarrolló una corriente de entrada de características muy similares a la corriente excitatoria. B. La corriente activada por AMPc desenjaulado fue bloqueada por concentraciones micromolares de LY83583 (panel izquierdo) pero no se vio afectada por SQ22536 (panel derecho). C. DIDS bloqueó gran parte de la corriente excitatoria activada por AMPc desenjaulado (panel izquierdo). En el panel derecho se muestra una respuesta más rápida a AMPc desenjaulado que la mostrada en A, panel derecho, y cuya frecuencia de aparición es de 1 en 10 células estimuladas. D. Curva I-V de la corriente activada por AMPc desenjaulado. Todos los pulsos de luz UV fueron de 500 ms y la concentración de AMPc enjaulado fue en todos los casos de 500  $\mu$ M.

De este modo pudimos obtener respuestas a  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado y AMPc desenjaulado. Respuestas típicas a AMPc obtenidas a diversos potenciales de mantención ( $n=12$ ) se observan en la figura 10. Ahí se puede apreciar la similitud entre la corriente generada por la liberación de AMPc con aquella generada por un estímulo con odorantes de la mezcla F (Figura 10A). Se han observado corrientes más rápidas en respuesta a AMPc desenjaulado, como la que se muestra en la figura 10C (panel derecho), pero estas son menos frecuentes. La farmacología de la corriente dependiente de AMPc mostrada en B en los paneles izquierdo y derecho presenta fuerte semejanza con lo reportado para respuestas a odorantes del tipo floral-frutal. Así, la activación de la CNGC por liberación de AMPc fue sensible a LY83583 ( $n=5$ ), pero no a SQ22536 ( $n=3$ ), dado que este último afecta a la enzima la adenilil ciclasa, componente anterior a la CNGC en la cascada de transducción (Figura 10B, panel derecho). El efecto de DIDS (un bloqueador de canales de  $\text{Cl}^-$ ), probado en dos NOs se muestra en el panel izquierdo de la figura 10C. La curva I-V de la respuesta a AMPc se muestra en la parte D de la figura. Esta curva se asemeja a la de la corriente de excitación en respuesta a odorantes.

**Los odorantes pútridos inducen una corriente de entrada a potenciales cercanos al potencial de reposo de la NO.**

Si los odorantes pútridos funcionan de manera similar a los de la mezcla F, en términos de activar la cascada del AMPc y posteriormente la CNGC induciendo incrementos intraciliares de  $\text{Ca}^{2+}$ , se esperaría ver una corriente de entrada activada por odorantes pútridos en condiciones de reposo. Debido al pequeño tamaño de esta corriente, su estudio

se abordó previamente reemplazando el  $\text{Ca}^{2+}$  externo por  $\text{Ba}^{2+}$  a una concentración diez veces mayor a la del  $\text{Ca}^{2+}$  normal, y dejando al  $\text{Ba}^{2+}$  como el único ion permeante [Morales, *et al.*, 1997], aprovechando el hecho que este catión permea mejor que  $\text{Ca}^{2+}$  por varios de los canales de calcio [Hille, 1994]. Yo utilicé una estrategia alternativa que me permitió estudiar esta corriente sistemáticamente en condiciones iónicas normales. Utilizamos un protocolo de estimulación repetitiva con pulsos breves de odorantes pútridos a baja concentración y la promediación de los diferentes trazos de corriente obtenidos. Así, resolví una corriente de entrada cuya magnitud varió entre los 5 y 25 pA ( $n=4$ , de un total de 14 NOs, 29%) frente a estímulos con odorantes pútridos; la mayor respuesta obtenida se muestra en la figura 11A. En estos experimentos se utilizó la mezcla P a una concentración no mayor a 10  $\mu\text{M}$  (3,3  $\mu\text{M}$  de cada odorante). En cada experimento fueron promediados entre 3 y 5 trazos de corriente. Estos experimentos se realizaron a potenciales de mantención entre -70 y -90 mV, donde la posibilidad de ver supresión por odorantes de las corrientes dependientes de potencial es mínima, dado que estos potenciales están por debajo del umbral de activación de las corrientes dependientes de potencial de las NOs, lo que nos aseguraba que no veríamos un fenómeno diferente del de la activación de corrientes de entrada en respuesta a estos odorantes. Tanto la promediación, como el hecho de realizar estos experimentos a potenciales de mantención más negativos aumentando con esto la fuerza electromotriz para el  $\text{Ca}^{2+}$ , nos permitieron medir esta corriente que no pudo ser resuelta anteriormente en condiciones iónicas normales.

La cadaverina, otro odorante pútrido, fue más eficiente en generar una corriente de

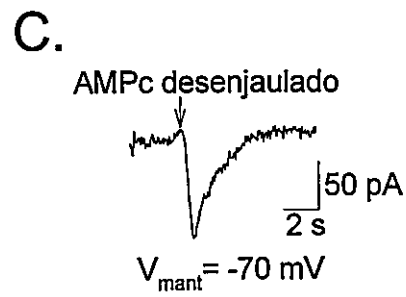
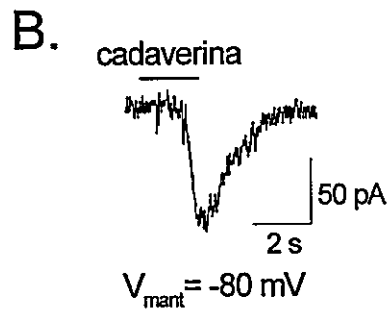
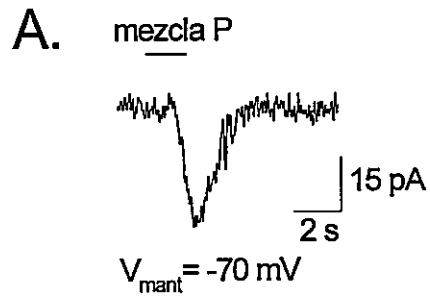


Figura 11

**Figura 11. Corrientes de entrada activadas por odorantes pútridos.** La mezcla P (de tres odorantes pútridos), y el odorante pútrido cadaverina, generan corrientes de entrada al potencial de reposo en las NOs. A. El trazo de corriente mostrado corresponde al promedio de tres trazos bajo estimulación con odorantes pútridos. B. La cadaverina (50  $\mu\text{M}$ ) induce corrientes de características similares a la anterior en las mismas condiciones. C. Un pulso de 10 ms de luz UV libera AMPc desde su compuesto enjaulado (200  $\mu\text{M}$  AMPc enjaulado en la pipeta de patch), activando una corriente de entrada de propiedades semejantes a las obtenidas con la mezcla de odorantes pútridos y con cadaverina.

entrada en las mismas condiciones experimentales (n= 4 de 8 NOs) (Figura 11B). Por otra parte, al estimular una NO cargada con 200  $\mu$ M AMPc enjaulado, con un pulso breve de luz UV de 10 ms (el tamaño de la respuesta depende directamente de la concentración del mensajero enjaulado, de la duración y de la intensidad del pulso de luz UV, y de cada célula), observamos una corriente de entrada de características muy similares a aquella inducida por los odorantes pútridos (Figura 11C) (n= 4).

Estos resultados, unidos a los expuestos en los tres puntos anteriores, son consistentes con la idea de que los odorantes pútridos funcionarían a nivel ciliar de manera similar a los odorantes de la mezcla F, es decir, induciendo una corriente de entrada al potencial de reposo por activación de la CNGC y generando incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del cilio olfatorio por esta misma vía.

**El  $\text{Ca}^{2+}$ , liberado desde un compuesto jaula, activa tanto corrientes de  $\text{Cl}^-$  como corrientes de  $\text{K}^+$  en NOs.**

Como hemos dicho, un paso necesario para la activación de la corriente de  $\text{K}^+$  inhibitoria es la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y el posterior incremento intraciliar de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. Sin embargo, hasta ahora carecíamos de una evidencia directa que mostrara que una elevación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la NO activa la corriente inhibitoria. Utilizando la estrategia de elevar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la NO de manera controlada a través de la liberación del divalente a partir del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ - DMNitrofenol (o  $\text{Ca}^{2+}$  enjaulado) por pulsos de luz UV, observamos la activación tanto de corrientes de  $\text{Cl}^-$  como de  $\text{K}^+$ . A diferencia del AMPc enjaulado, que puede generar respuestas máximas en

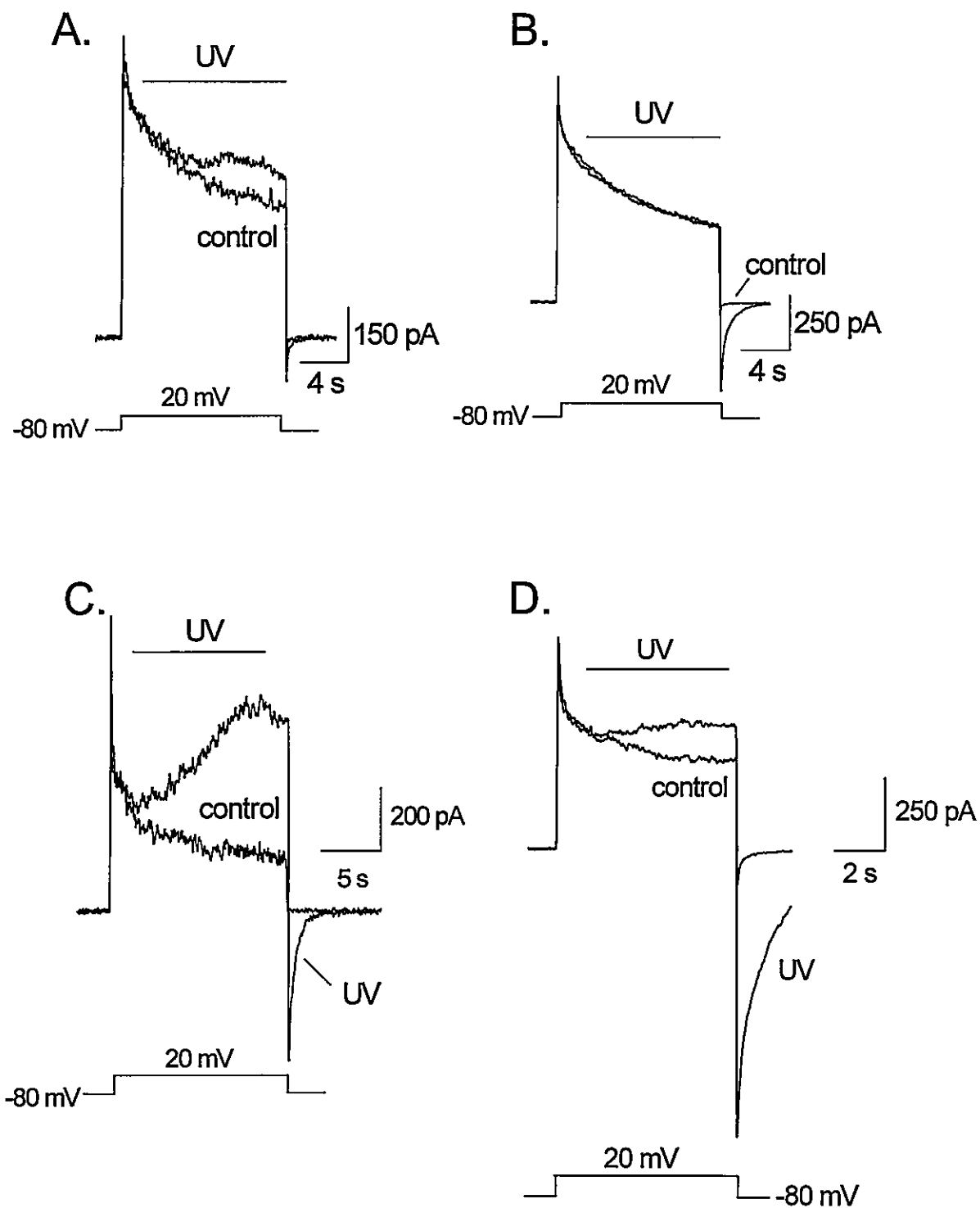


Figura 12



III.

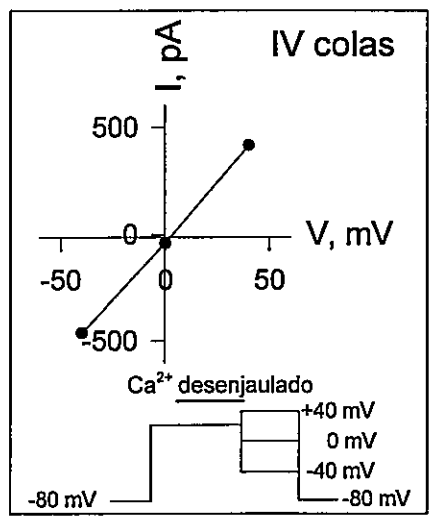


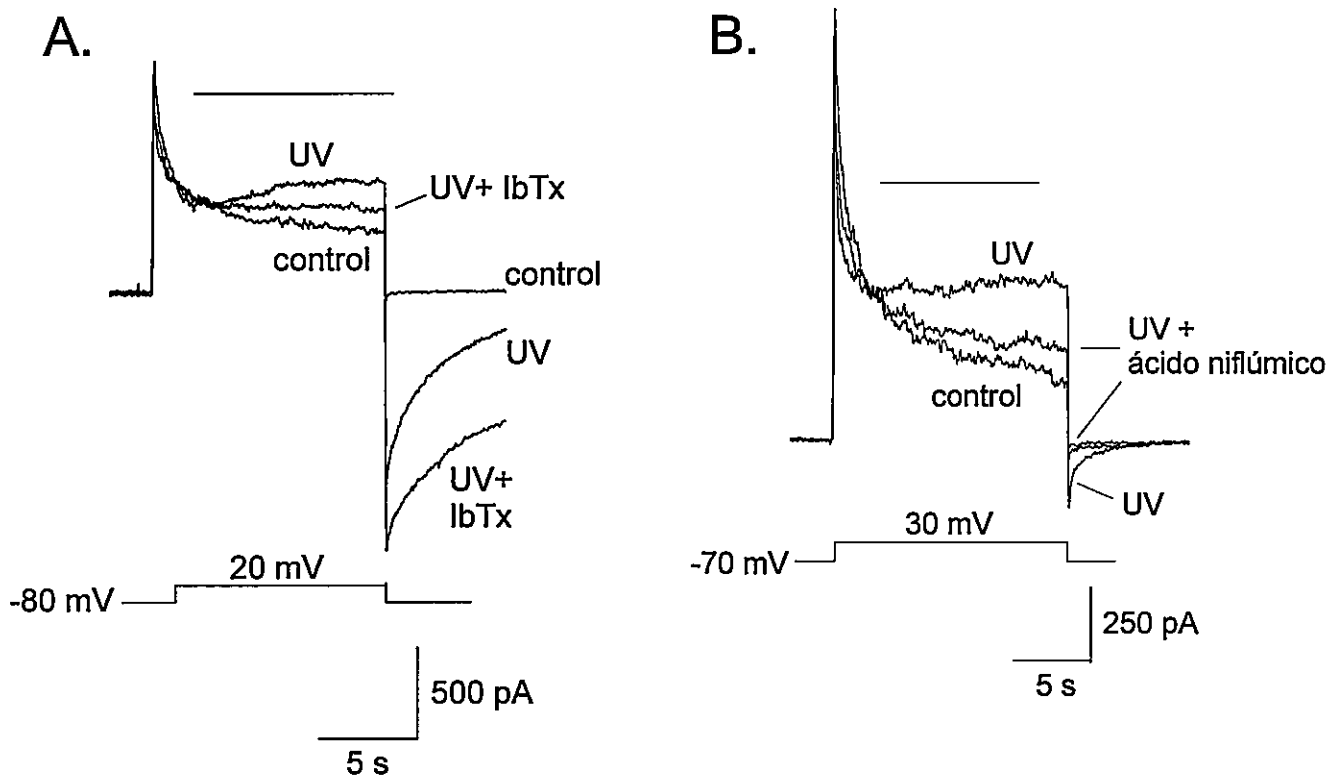
Figura 12

**Figura 12. Diversos patrones de corrientes de célula completa inducidas por  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado.** A. En algunas células, como la mostrada en A, el  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado activó una corriente de salida seguida por una pequeña corriente de cola de entrada cuando el potencial de membrana fue devuelto a  $-80$  mV. B. En otras células, no hubo presencia de corrientes de salida a  $+20$  mV, sino sólo una cola desarrollada bajo el retorno a  $-80$  mV. C. Otras células presentaron una corriente de salida predominante seguida por una corriente de cola de entrada. D. En otras células, la corriente de cola fue mucho más prominente aún, señal de mayor activación de la corriente de  $\text{Cl}^-$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . E. Curva I-V de la corriente de cola activada por  $\text{Ca}^{2+}$ .

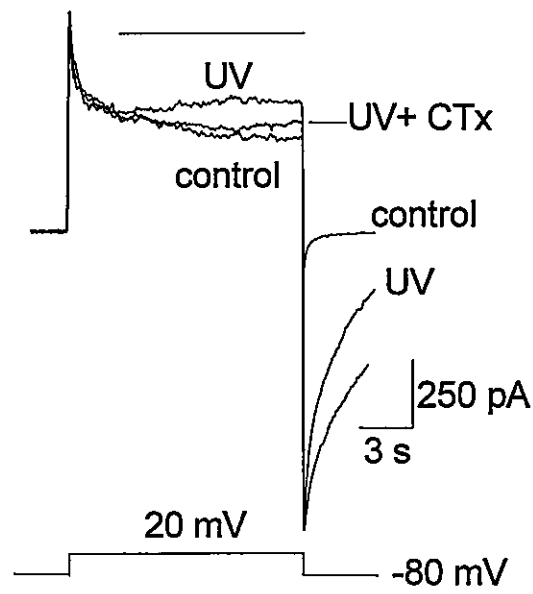
NOs frente a pulsos de luz tan breves como 100 ms, el  $\text{Ca}^{2+}$  enjaulado requiere, para obtener la respuesta máxima de la célula, que el pulso de luz sea de al menos 2 s. La figura 12 muestra patrones representativos de corrientes obtenidas en cuatro diferentes NOs frente a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el panel A es posible observar principalmente la activación de una corriente de salida, consistente con la idea de que una corriente de  $\text{K}^+$  sería activada en esta célula como respuesta al  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado ( $n= 3$ ). Esto es así porque, de haberse activado la conductancia de  $\text{Cl}^-$  (que a este potencial también debería generar una corriente también de salida), la corriente de  $\text{K}^+$  debería ir acompañada de una corriente de cola prominente, como resultado de la vuelta a un potencial de membrana donde el  $\text{Cl}^-$  fluiría hacia el exterior de la célula por los canales abiertos a +20 mV por el  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado; en el ejemplo en A, el tamaño de la cola es despreciable. Por otro lado, en la célula mostrada en el panel B, no se resuelve una corriente de salida, pero se observa una corriente de cola. Ésta sería reflejo de la activación principalmente de la corriente de  $\text{Cl}^-$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $n= 7$ ). En la célula mostrada en C, ambas corrientes se activaron, como lo sugiere la robusta corriente de salida seguida de una corriente de cola prominente ( $n= 9$ ). En D se muestra una célula con una mucho mayor corriente de cola de entrada ( $n= 18$ ) que en los casos anteriores. Este último es el patrón más común, y probablemente se deba a una mayor densidad de corriente de  $\text{Cl}^-$  que de  $\text{K}^+$  en estas células. Las corrientes de cola activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  siguen el comportamiento óhmico, con inversión a 0 mV ( $n= 3$ ) esperado para la corriente de  $\text{Cl}^-$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  involucrada en la respuesta excitatoria (Figura 12E). Sin embargo, la verificación de la identidad de las corrientes que son activadas por el  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado está dada por los experimentos farmacológicos detallados enseguida.

### **Farmacología de las corrientes de salida dependientes de $\text{Ca}^{2+}$ .**

En la figura 13A, mostramos cómo la corriente de salida de una NO inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado fue abolida en una proporción considerable por 20 nM IbTx (un bloqueador altamente específico de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ ) (n= 3). En la figura 13B, la corriente de salida inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  en otra NO es ampliamente reducida por ácido niflúmico 10  $\mu\text{M}$  (un bloqueador de canales de cloruro), aplicado previo al estímulo con luz UV o en el máximo de la corriente (no mostrado) (n= 4). En la célula mostrada en B queda un remanente de corriente de salida insensible al ácido, que podría corresponder a la corriente de  $\text{K}^+$ , sugiriendo que ambas conductancias podrían haber sido activadas simultáneamente. El bloqueo inducido por CTx (un efectivo bloqueador de la corriente de  $\text{K}^+$  inhibitoria en NOs [Morales *et al.*, 1995]), se muestra en la figura 14. La magnitud de este bloqueo varió de célula en célula (n= 4), e incluso en algunas de las NOs estudiadas éste no tuvo efecto, lo que es congruente con la idea de que la magnitud relativa de las corrientes de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  varía de célula en célula. Es interesante destacar que las corrientes de salida activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado son estudiadas a potenciales cercanos o superiores a 0 mV. Esto es debido a que, a potenciales de membrana menos despolarizados, las corrientes de  $\text{K}^+$  se encontrarían apantalladas por la corriente de entrada asociada a la conductancia de  $\text{Cl}^-$  excitatoria, y a que la magnitud de la corriente de  $\text{K}^+$  es mucho mayor a potenciales más despolarizantes con un máximo a +20 mV. Estos resultados sugieren que, en principio, ambas conductancias (de  $\text{K}^+$  inhibitoria y de  $\text{Cl}^-$  excitatoria) podrían activarse durante un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intraciliar inducido por odorantes.



**Figura 13.** La corriente de salida activada por  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado tiene dos componentes: uno es sensible a ácido niflúmico y el otro es sensible a IbTx. A. 20 nM IbTx bloqueó parcialmente la corriente de salida inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ . B. 20  $\mu\text{M}$  de ácido niflúmico eliminó, en gran proporción, la corriente de salida activada por  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado cuando es aplicado antes del pulso de luz.



**Figura 14. La corriente de salida activada por  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado es sensible a CTx.**

20 nM CTx abolió gran parte de la corriente de salida en la célula mostrada en la figura.

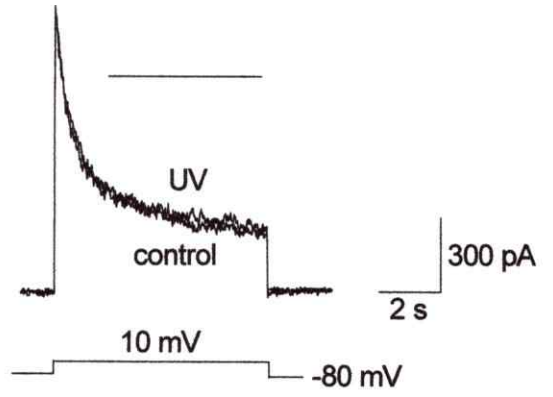
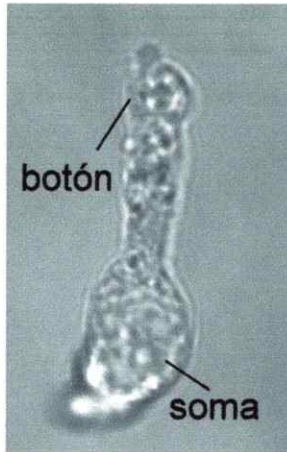
**Las conductancias que se activan al desenjaular  $\text{Ca}^{2+}$  están localizadas en los cilios olfatorios.**

Los cilios olfatorios son las estructuras de las NOs donde se concentra la maquinaria de quimiotransducción. En el proceso de disociación mecánica, algunas de las NOs pierden sus cilios. Estas células conservan todas las características electrofisiológicas de la NO intacta, excepto que carecen de la capacidad de transducir odorantes. Utilizando como herramienta el  $\text{Ca}^{2+}$  enjaulado y comparando su efecto en NOs con y sin cilios, examinamos si la corriente de  $\text{K}^+$  inhibitoria y la corriente de  $\text{Cl}^-$  excitatoria activadas por liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  están confinadas a los cilios olfatorios. La figura 15 muestra cómo en células carentes de cilios la liberación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  no activó corrientes de salida ni de cola (Figura 15A), fenómeno observado en todos los potenciales de membrana estudiados, en el 80% de las células ( $n= 10$ ). El panel derecho, en la parte B de la figura, muestra una célula con el patrón típico de corrientes activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado. En las NOs con cilios, el 76% de las células respondió con corrientes de salida o de entrada ( $n= 72$ ).

Hay que hacer notar que las corrientes de  $\text{Cl}^-$  y de  $\text{K}^+$  ciliar sólo se activan bajo el efecto de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por luz UV, y no por el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a la célula por los canales de calcio somáticos dependientes de potencial y que se activan en respuesta al pulso despolarizante, como se observa en los trazos control. Esto predice la existencia de una barrera a la difusión del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular entre el soma y los cilios; esta barrera podría corresponder al intercambiador  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ , que se encarga de sacar el  $\text{Ca}^{2+}$  del lumen ciliar durante una respuesta a odorantes [Reisert y Mathews, 1998; ver DISCUSION].

A.

NO sin cilios



B.

NO con cilios

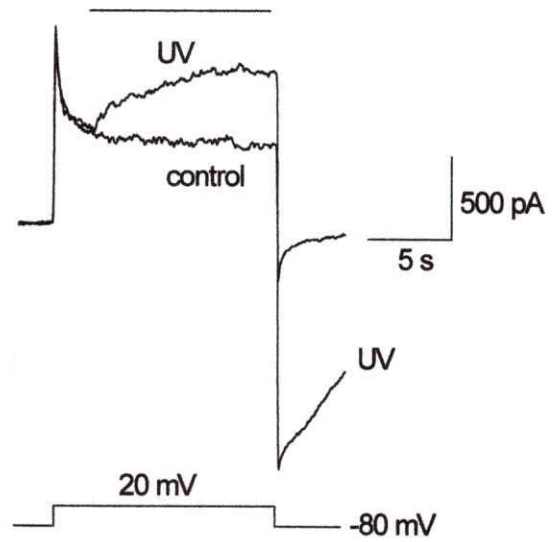
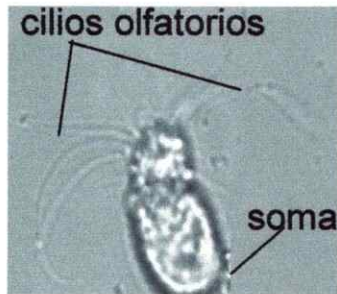


Figura 15



**Figura 15. Las conductancias activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado residen en los cilios olfatorios.** A. Imagen de contraste de fase (panel izquierdo) de una neurona olfatoria que carece de cilios. En el 80% (8 de 10) de las células de estas características fuimos incapaces de resolver corrientes de salida y de cola en respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado (A, panel derecho). B. Imagen de contraste de fase de una célula olfatoria con cilios (panel izquierdo). En células como ésta (55 de 72 NOs, 76 %) pudimos observar corrientes de salida y/o de cola en respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **Respuestas despolarizantes e hiperpolarizantes a incrementos de $\text{Ca}^{2+}$ liberado desde el compuesto jaula.**

Dado que nuestro postulado indica que dos conductancias con efectos eléctricos contrapuestos serían activadas por los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  controlados por luz UV, el potencial de membrana de la neurona debería reflejar la activación de ambas. Estudiamos el efecto de  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado sobre el potencial de membrana de la NO en configuración de célula completa y bajo corriente controlada. Observamos tanto despolarizaciones (Figura 16A) ( $n=4$ ) como hiperpolarizaciones (Figura 16B) ( $n=2$ ) en respuesta a  $\text{Ca}^{2+}$  en distintas NOs. En el caso de las respuestas despolarizantes, éstas disminuyeron en magnitud a medida que el potencial de membrana se cambió a valores más despolarizados, inyectando corriente (Figura 16A, recuadro de la derecha). Esto hace sentido con la disminución de la resistencia de entrada de la neurona a medida que la membrana se despolariza. En el caso de las respuestas hiperpolarizantes, la dependencia con el potencial de membrana es más difícil de determinar, debido en parte a que la frecuencia con la que se observan estas respuestas es menor (2 de 10 NOs), y a que el rango de efectividad de la corriente inhibitoria se ve limitado por la cercanía con el potencial de inversión para el ion  $\text{K}^+$  (-100 mV), por la disminución de la resistencia de entrada a potenciales más despolarizados y por la presencia de las corrientes excitatorias. La resistencia de entrada de una NO de *Caudiverbera* es usualmente de varios  $\text{G}\Omega$  a -80 mV, potencial cercano al potencial de reposo; por lo tanto, las respuestas hiperpolarizante y despolarizante observadas frente a  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado mostradas en la figura 16A y B deben ser el resultado de una corriente neta no mayor que unos pocos picoamperios, como lo sugiere el fuerte efecto de

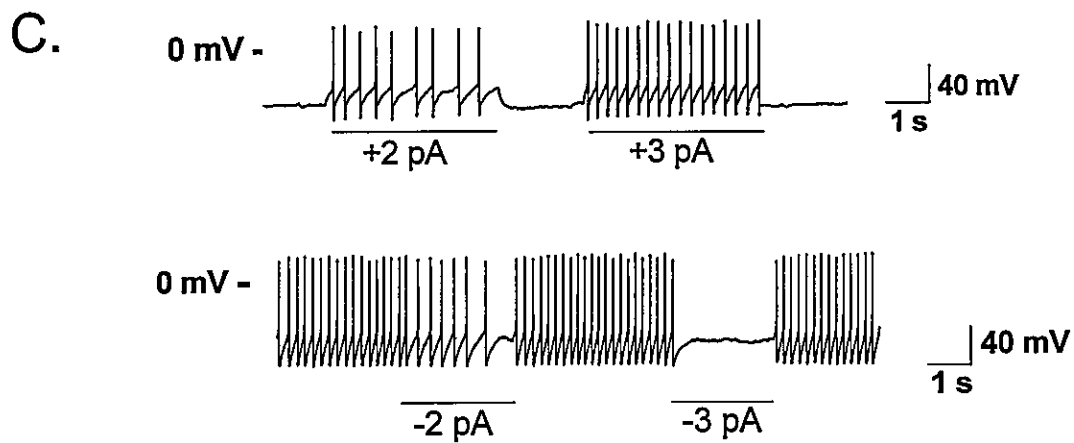
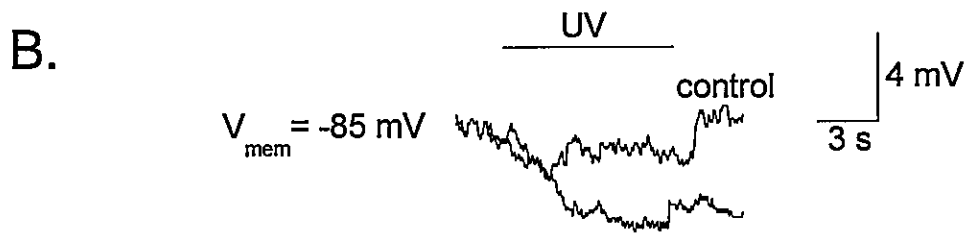
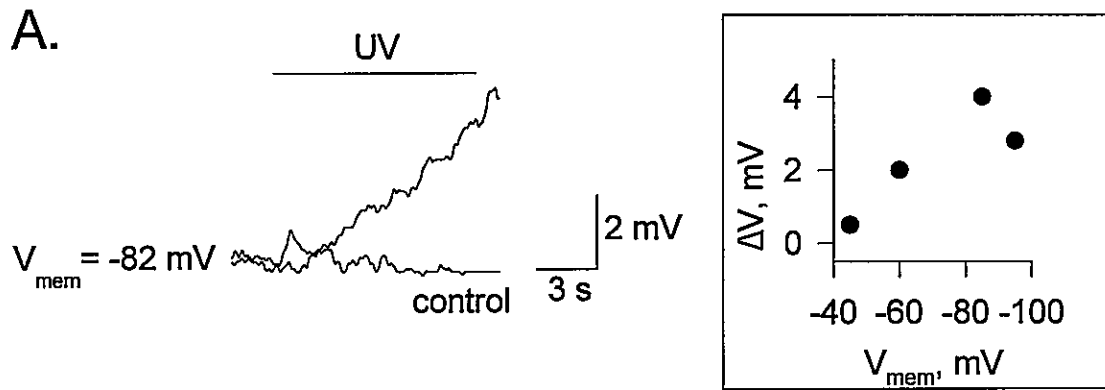


Figura 16

**Figura 16. El  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado puede inducir tanto respuestas despolarizantes como hiperpolarizantes en diferentes NOs. Despolarización (A) e hiperpolarización (B) inducidas por  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado en diferentes neuronas olfatorias. En el panel derecho en A se muestra la dependencia de potencial de la respuesta despolarizante, promedio de tres células. C. La actividad eléctrica de las NOs puede ser modificada por una pequeña corriente (2 - 3 pA) positiva (célula mostrada arriba) o negativa (célula mostrada abajo) bajo corriente controlada.**

la inyección de un pulso de corriente positiva o negativa de 2 ó 3 pA en NOs bajo corriente controlada (Figura 16C).

**La corriente activada por AMPc liberado desde un compuesto jaula activa dos componentes: uno de  $K^+$  y otro de  $Cl^-$ .**

Los resultados presentados hasta el momento sugieren que la corriente de  $K^+$  inhibitoria se desarrollaría luego de la activación de la CNGC por AMPc, y que estaría acompañada de la corriente de  $Cl^-$  excitatoria. Por lo tanto, es importante determinar si se induce la corriente inhibitoria en una célula que es expuesta a incrementos intracelulares de AMPc. La liberación de AMPc por luz UV desde el compuesto jaula activa la CNGC. Como esta conductancia es permeable a  $Ca^{2+}$ , esto genera como consecuencia un incremento de los niveles de  $Ca^{2+}$  intraciliar (aunque de un modo indirecto, a diferencia de la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el  $Ca^{2+}$ -enjaulado) lo que podría activar a la corriente de  $K^+$  inhibitoria. Pudimos resolver la activación de la corriente de  $K^+$  inhibitoria en una condición en que se impidió el desarrollo de la corriente de  $Cl^-$  excitatoria. En la figura 17 (izquierda, arriba) se muestra el patrón típico de una respuesta a un pulso prolongado de luz UV de moderada intensidad, a un potencial despolarizante de 20 mV, en una célula cargada con AMPc enjaulado. Destacan tanto la robusta corriente de salida como la cola de entrada; este patrón se observó en la mayoría de las células estimuladas (n= 5 de 7). El recuadro inferior izquierdo corresponde a la diferencia entre el trazo correspondiente al control y el trazo de corriente en presencia del pulso de luz UV. En otra célula (Figura 17, derecha), se estudió

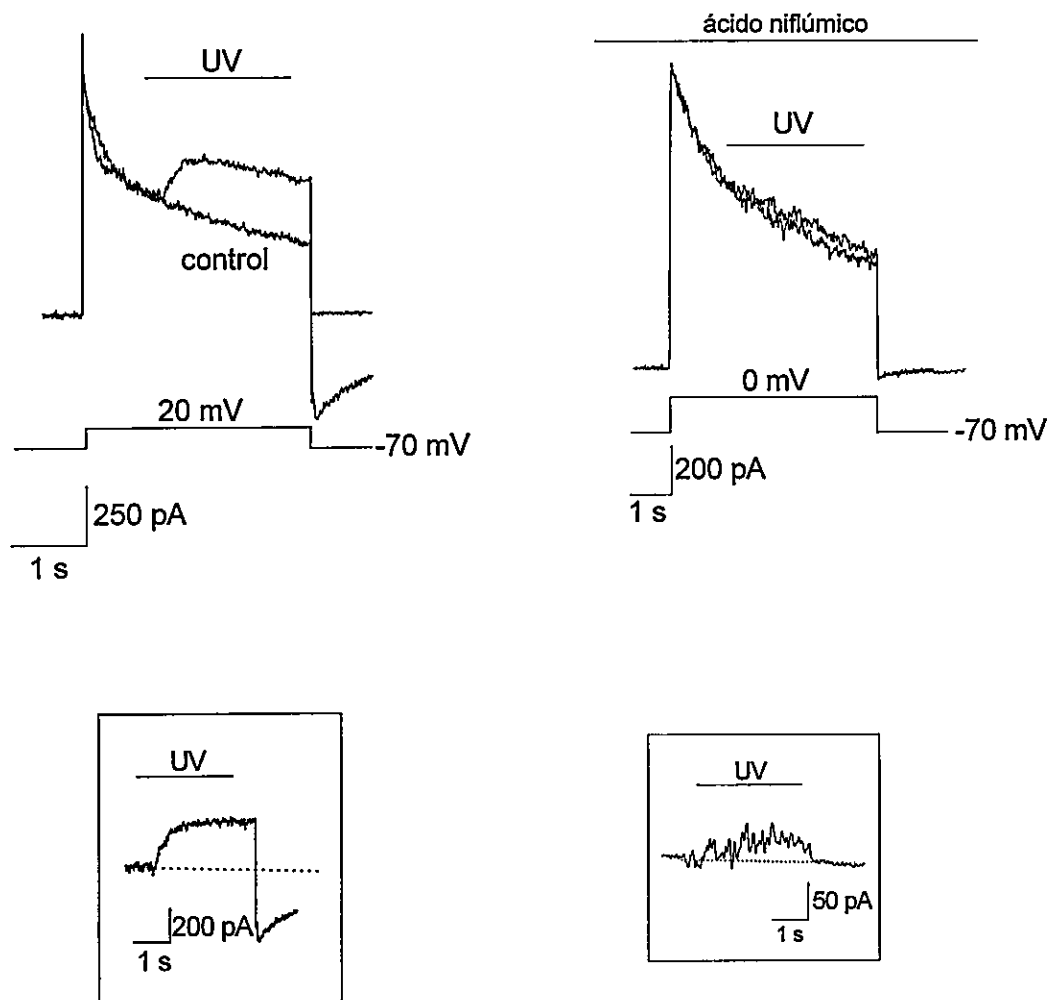


Figura 17

**Figura 17. La corriente de salida activada por AMPc desenjaulado tiene dos componentes.** En el panel superior izquierdo de la figura se muestra la corriente de célula completa en una NO cuyo potencial de membrana fue fijado a +20 mV, y que es estimulada con AMPc por un pulso de luz UV. En el panel superior derecho otra célula, que en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de ácido niflúmico y con su potencial fijado a 0 mV presentó una corriente de salida insensible al ácido, supuestamente la componente inhibitoria de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ; ambas células fueron cargadas con 200  $\mu\text{M}$  AMPc enjaulado a través de la pipeta de "patch-clamp". El panel izquierdo inferior muestra la corriente inducida por AMPc en la célula en el panel izquierdo superior. La corriente inducida por AMPc en la célula del panel derecho superior se muestra en el panel derecho inferior.

el efecto de un pulso prolongado de luz UV en presencia de ácido niflúmico a 0 mV (potencial de inversión de la corriente de Cl<sup>-</sup>). En estas condiciones pudimos resolver una corriente de salida en dos NOs, que no estaba seguida de la corriente de cola excitatoria, lo que sugiere que corresponde solamente a la corriente inhibitoria. El panel inferior derecho de la figura muestra la diferencia entre el control y la corriente en presencia de AMPc. Estos resultados son consistentes con la idea que incrementos de AMPc pueden gatillar tanto la activación del componente excitatorio como del inhibitorio de la respuesta a odorantes, y argumentan a favor de que tanto en la quimiotransducción inhibitoria como en la excitatoria participan el Ca<sup>2+</sup> y el AMPc como mediadores secundarios.

**La corriente de K<sup>+</sup> inhibitoria inducida por odorantes pútridos tiene dos componentes: uno dependiente y otro independiente del AMPc.**

La cadaverina, un odorante pútrido, fue probada por primera vez en nuestros estudios en la búsqueda de odorantes que dieran un mayor porcentaje de respuestas y, por lo tanto, que facilitarían la detección de las corrientes de K<sup>+</sup> inhibitorias. Este odorante, asociado a la descomposición de material orgánico, indujo robustas corrientes de salida de K<sup>+</sup> en NOs. Sin embargo, los resultados obtenidos con cadaverina (y también con los odorantes pútridos de la mezcla P) nos llevaron a descubrir un nuevo componente en el mecanismo de la respuesta inhibitoria: la activación directa por odorantes pútridos de corrientes de K<sup>+</sup> en la membrana plasmática no ciliar. Utilizamos el bloqueador de la CNGC (LY83583) sobre la corriente activada por cadaverina, con la idea de que si la activación de la corriente de K<sup>+</sup> inhibitoria depende de la CNGC (como lo sugieren las evidencias presentadas hasta ahora),



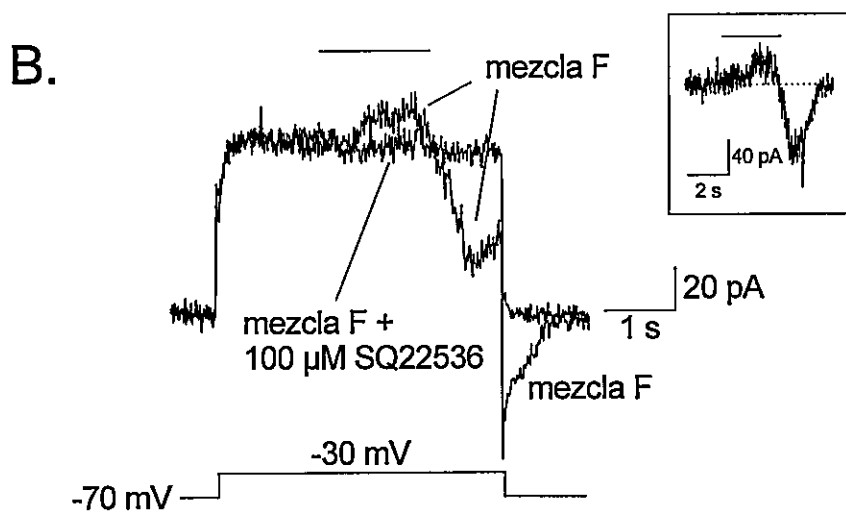
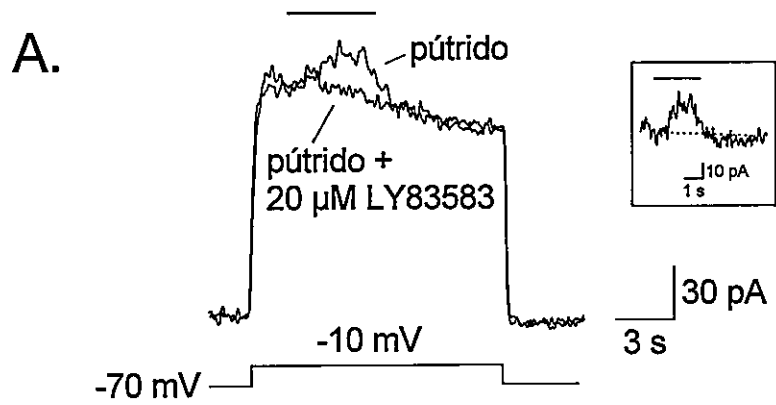


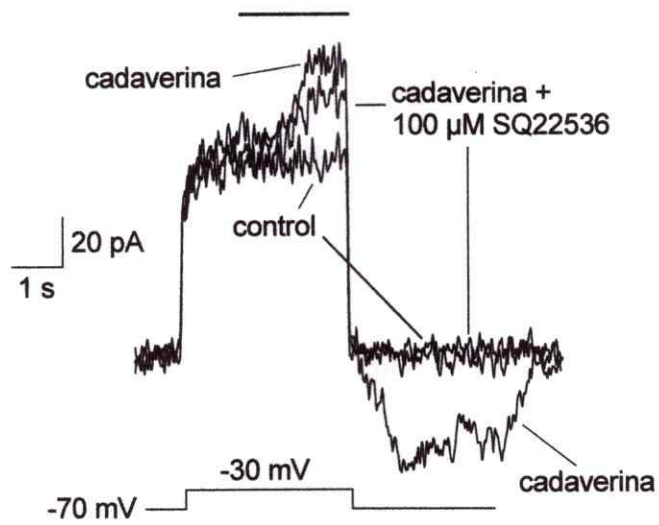
Figura 18

**Figura 18. La corriente de  $K^+$  inducida por odorantes es sensible a LY83583 y SQ22536.** A. Corriente de  $K^+$  inducida por cadaverina en una célula cuyo potencial fue fijado en -30 mV; la corriente resultante del estímulo con 50  $\mu$ M del odorante fue en esta célula sensible a 20  $\mu$ M del bloqueador de la CNGC, LY83583. Recuadro: corriente neta abolida por la droga. B. Una corriente de salida y otra de entrada seguidas por una cola de entrada fueron inducidas por un pulso de 30  $\mu$ M de la mezcla F. Ambas corrientes son abolidas después de la incubación de la célula con 100  $\mu$ M SQ22536 por 1 minuto; el recuadro de la derecha ilustra la diferencia de los trazos de la figura B, y corresponde a la corriente abolida por el bloqueador.

ésta debería ser sensible a LY83583. Como muestra la figura 18A, la corriente activada en esta célula por 100  $\mu\text{M}$  de cadaverina fue abolida por 20  $\mu\text{M}$  de LY83583; esto ocurrió en 3 de 5 NOs. Sin embargo, en las otras dos células la corriente de  $\text{K}^+$  activada por cadaverina no fue afectada visiblemente por esta droga, lo que no era explicado por nuestro modelo. Según este modelo, la activación de la corriente de  $\text{K}^+$  inhibitoria depende de la activación de la CNGC, la que a su vez depende de la activación de la adenilil ciclasa ciliar, y predice que un inhibidor de la actividad de esta enzima debiera impedir el desarrollo de la corriente inhibitoria. Como se ve en la figura 18B, la incubación de una NO por 1 minuto en 100  $\mu\text{M}$  SQ22536 previo a la estimulación con odorantes impidió el desarrollo de la corriente inhibitoria, que aparece aquí como una corriente de salida frente al estímulo odorífero. En esta célula, la corriente inhibitoria está acompañada por la corriente excitatoria, la que se observa como una corriente de entrada durante la despolarización seguida de una robusta corriente de cola. Ambas fueron también abolidas por la droga. Esto fue observado en dos NOs. Sin embargo, en otros cinco casos solamente la corriente excitatoria despolarizante fue eliminada por SQ22536, mientras que la inhibitoria hiperpolarizante no fue significativamente afectada, como se observa en las figuras 19A y B, lo que no hacía sentido con el modelo.

Estos resultados, unidos al hecho que en el 67% de los casos las corrientes de  $\text{K}^+$  dependientes de odorantes estudiadas a 0 mV no van acompañadas por una activación evidente de la CNGC (la que debería expresarse como una corriente de cola de entrada), nos sugirieron que el fenómeno inhibitorio parecía ser más complejo de lo que suponíamos e implicaba otro proceso adicional no descrito hasta ese momento. Esto nos llevó a explorar

A.



B.

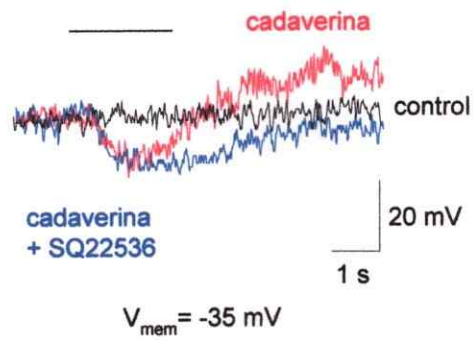


Figura 19

**Figura 19. La corriente de  $K^+$  activada por odorantes puede ser insensible a SQ22536.**

A. Célula en que la corriente de salida (aquí activada por 50  $\mu$ M cadaverina) fue muy poco disminuída por SQ22536, mientras que la corriente de cola excitatoria fue totalmente abolida por la droga. B. En la misma célula mostrada en A, cadaverina indujo una hiperpolarización seguida de una despolarización, resultado de activación de la conductancia de  $K^+$  y de las conductancias excitatorias respectivamente. La abolición de las conductancias excitatorias por SQ22536 elimina el componente despolarizante, dejando sólo la hiperpolarización.

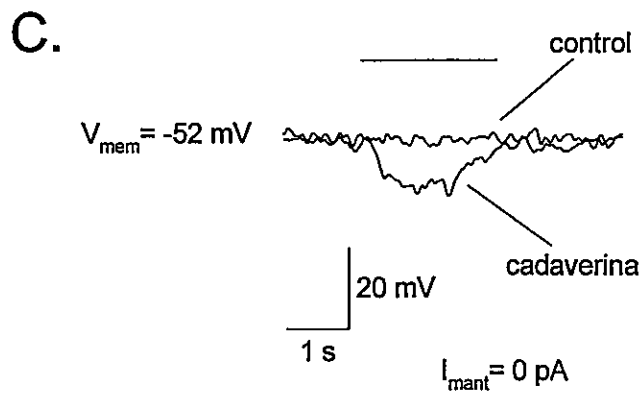
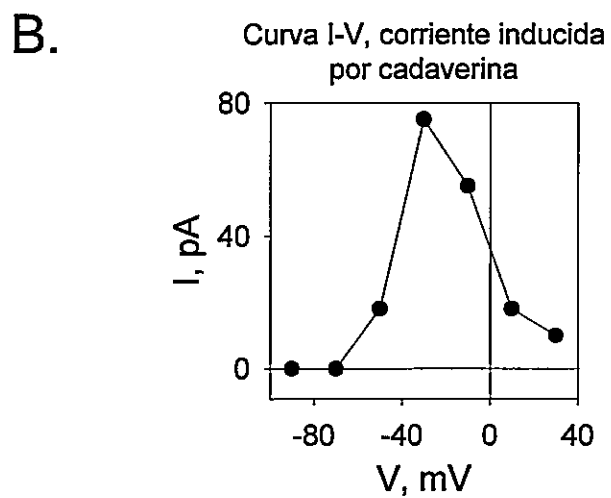
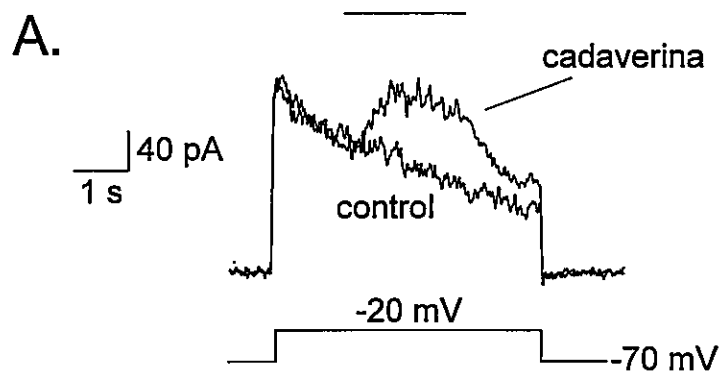


Figura 20

**Figura 20. Efecto de odorantes pútridos en NOs carentes de cilios.** A. Corriente de  $K^+$  activada por un pulso de 50  $\mu$ M cadaverina en una célula cuyo potencial fue mantenido a -20 mV. B. Curva I-V de la corriente activada por cadaverina en NOs carentes de cilios. C. Hiperpolarización inducida por un estímulo equivalente bajo corriente controlada, en la misma célula.

la posibilidad que la corriente de  $K^+$  activada por odorantes correspondiera en realidad a la suma de dos componentes, uno dependiente y otro independiente de la cascada del AMPc. El primer candidato para ser el componente independiente de la vía del AMPc eran las conductancias de  $K^+$  del cuerpo celular. Las NOs de *Caudiverbera* presentan dos conductancias de  $K^+$  en la membrana plasmática no ciliar: una tipo rectificador tardío y otra dependiente de  $Ca^{2+}$ ; esta última se diferencia de la conductancia de  $K^+$  ciliar inhibitoria por su insensibilidad a CTx e IbTx [Delgado y Labarca, 1993; Morales *et al.*, 1995; Esta Tesis].

#### **Odorantes pútridos en NOs carentes de cilios.**

Para estudiar este fenómeno, examinamos el efecto de odorantes pútridos sobre NOs carentes de cilios. Estos odorantes, que normalmente activan la corriente inhibitoria, tienen a su vez un pobre efecto de supresión, otro fenómeno que debe ser tomado en cuenta a la hora de estudiar las corrientes activadas por odorantes [Sanhueza y Bacigalupo, 1999]. En NOs sin cilios las corrientes de  $K^+$  ciliares debieran estar ausentes y cualquier corriente de  $K^+$  activada debería corresponder a un componente independiente de la cascada del AMPc.

La cadaverina y la mezcla P (trietilamina, pirazina y ácido isovalérico) mostraron un efecto de supresión bajo y una alta eficacia para activar corrientes de  $K^+$ . Observamos que estos odorantes pútridos activaron una corriente de  $K^+$  en 10 de las 11 NOs carentes de cilios estudiadas (Figura 20A). La relación I/V de la corriente activada por cadaverina presenta un máximo, para luego decaer (Figura 20B), en todas las células estudiadas (n= 4). Los odorantes pútridos indujeron en estas células el desarrollo de un potencial de receptor



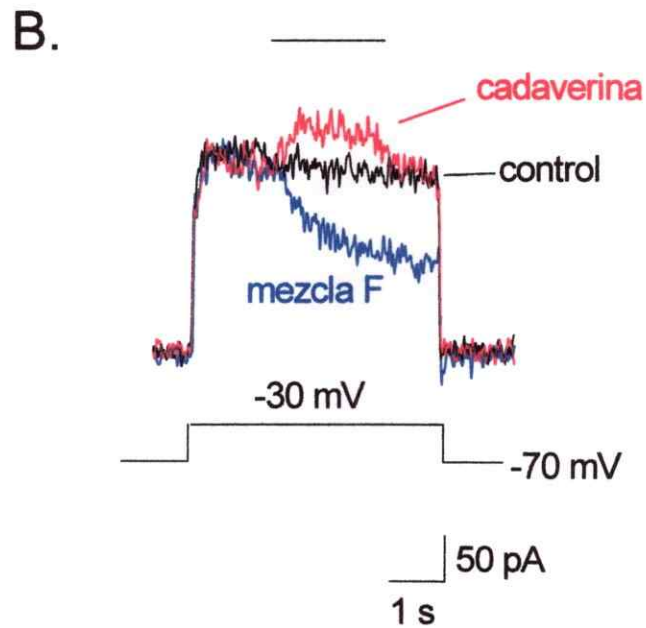
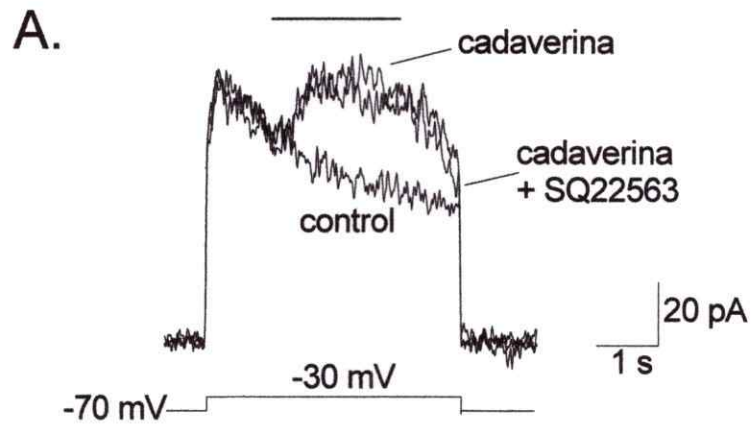


Figura 21

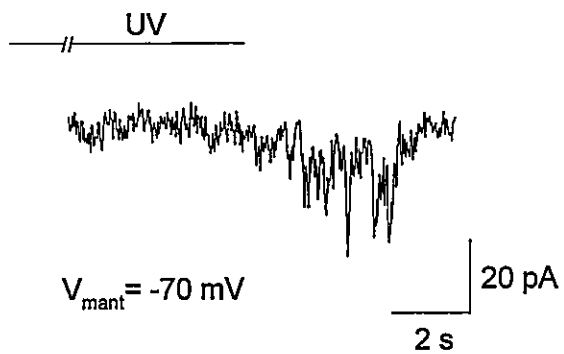
**Figura 21. Corrientes de  $K^+$  inducidas por odorantes pútridos en NOs sin cilios.** A. La corriente de  $K^+$  activada por cadaverina, en una NO sin cilios, es insensible a SQ22536. B. Esta misma célula presenta supresión de la corriente dependiente de potencial por la mezcla F (trazo inferior).

hiperpolarizante en condiciones de corriente controlada (Figura 20C) (n= 5), muy similar al dependiente de la activación de la conductancia de  $K^+$  ciliar. La corriente de  $K^+$  activada por odorantes pútridos en la membrana plasmática no ciliar fue insensible a SQ22536 (Fig 21A) (n= 4) y a LY83583 (no mostrado) (n= 2). El efecto de estos odorantes en células carentes de cilios se contrapone al efecto de odorantes del tipo floral y frutal (mezcla F), los que inducen una “corriente de supresión” al estimular la célula bajo el mismo protocolo experimental (Figura 21B). El tiempo que transcurre entre el inicio del estímulo con odorantes y el comienzo de la respuesta (el desarrollo de corriente de  $K^+$  somática en respuesta a odorantes) es mucho menor ( $51 \pm 21$  ms, n= 8) que el que se observa en la respuesta de la corriente de  $K^+$  ciliar, cuya latencia se encuentra entre los 100 y 1000 ms. Esta observación argumenta a favor de un mecanismo de acción directa de los odorantes, como ha sido postulado también para la supresión de corrientes dependientes de potencial en NOs de *Caudiverbera* [Sanhueza y Bacigalupo, 1999].

#### **Efecto de $InsP_3$ liberado a partir de un compuesto jaula.**

El  $InsP_3$  ha sido propuesto, como un posible mensajero secundario en la olfacción [Breer *et al.*, 1990; Boekoff *et al.*, 1990; Okada *et al.*, 1994; Revisado en Schild y Restrepo, 1998]. Sin embargo, estos últimos años las evidencias acumuladas sugieren que el  $InsP_3$  no sería indispensable para la respuesta a odorantes. Nosotros estudiamos de un modo preliminar el efecto de  $InsP_3$  en las NOs liberando  $InsP_3$  desde un compuesto jaula, lo que presenta ventajas importantes respecto a otras estrategias, como la diálisis directa de  $InsP_3$  o de análogos no hidrolizables de este mensajero químico, siendo la principal de

A.



B.

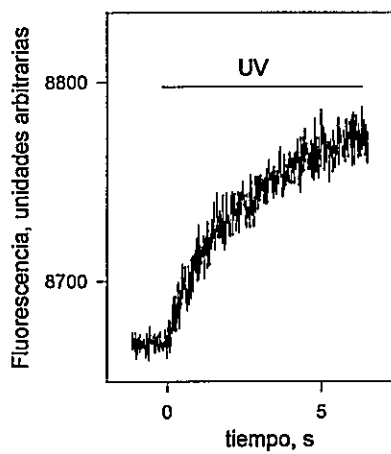


Figura 22

**Figura 22. Efecto de InsP<sub>3</sub> liberado desde un compuesto jaula en NOs.** A. Corriente resultante de la estimulación por 15 segundos con InsP<sub>3</sub> desenjaulado sobre una NO a potencial de reposo (n= 3 de 11 NOs estimuladas); la misma célula había sido previamente sometida a un pulso de luz UV de 10 segundos de duración que no produjo efecto. B. Control de la liberación de InsP<sub>3</sub>. Utilizando una alícuota de preparación de membrana de retículo endoplásmico de hígado de rata, resuspendidas en solución interna normal de NOs suplementada con 150 μM InsP<sub>3</sub> enjaulado y 20 μM Fluo 3, observamos un fuerte incremento de la fluorescencia inducido por un pulso de luz UV y que alcanza un máximo aproximadamente a los 7 segundos de iniciado el pulso. El aumento de fluorescencia se debe a la liberación de Ca<sup>2+</sup> al medio, desde las vesículas de retículo endoplásmico, inducido por el InsP<sub>3</sub> liberado por UV.

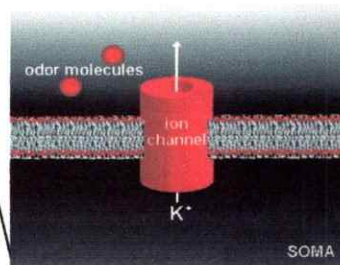
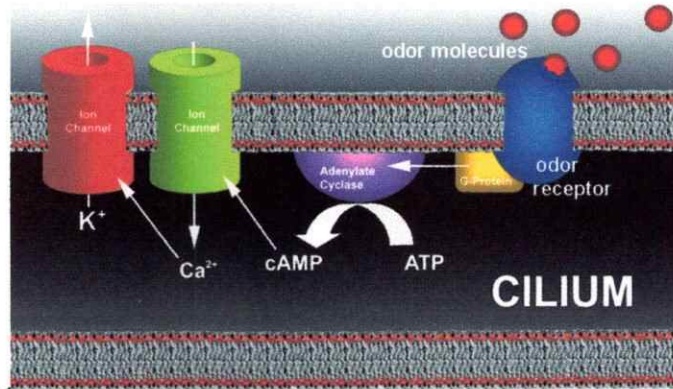
ellas la liberación reversible. Nuestras observaciones muestran la activación de una corriente de entrada a potenciales cercanos al potencial de reposo (en 3 de las 11 NOs examinadas) cuando la célula es sometida a pulsos sucesivos de 5 a 15 segundos de luz UV (Figura 22A). Con el fin de verificar que la luz UV estaba efectivamente liberando el  $\text{InsP}_3$  de la jaula, apliqué el mismo protocolo a vesículas de retículo endoplásmico de hígado de rata (Figura 22B) (gentilmente facilitadas por el Dr. Daniel Wolff y cuya habilidad para liberar  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a  $\text{InsP}_3$  había sido previamente demostrada [Surroca y Wolff, 2000]). Estas vesículas liberan  $\text{Ca}^{2+}$  al ser expuestas a  $\text{InsP}_3$  desenjaulado. Pude ver algún efecto del  $\text{InsP}_3$  liberado en las NOs a partir del compuesto jaula sólo cuando aplicamos varios pulsos consecutivos de luz de varios segundos de duración y siempre con la indefectible muerte de la NO. Por esto, nuestra impresión es que para tener un efecto del  $\text{InsP}_3$  necesitamos elevarlo a niveles tan altos que generan toxicidad en la NO; no hemos logrado observar un efecto claro y reproducible de este mensajero secundario sobre la conductancia de la membrana de las NOs a niveles razonables de éste. Nuestra conclusión es, por tanto, que el  $\text{InsP}_3$  no sería un componente indispensable para la respuesta a odorantes en vertebrados y que, de tener un papel, éste sería probablemente de tipo regulatorio sobre la cascada del AMPc.

### **Modelo para la respuesta inhibitoria a odorantes.**

Los resultados antes señalados nos permiten proponer un mecanismo para la respuesta inhibitoria detallado en la figura 23: un odorante, independiente de su naturaleza química, desencadena la vía que lleva a la activación de la CGNC a través de los incrementos intraciliarios de AMPc. Esto trae consigo un aumento en los niveles intraciliarios de  $Ca^{2+}$  y la subsecuente activación de la conductancia de  $K^+$  inhibitoria (Figuras 23A y 24B). Los odorantes pútridos pueden además inducir la activación de corrientes de  $K^+$  en la membrana plasmática no ciliar (Figuras 23B y 24A). La cascada de transducción excitatoria (Figura 24C) coexistiría en los cilios olfatorios con la de la respuesta inhibitoria y con la supresión por odorantes de los canales de transducción y los canales dependientes de potencial de la membrana plasmática (Figura 24D). Los factores que determinan que la respuesta neta de la célula sea excitatoria o inhibitoria se desconocen.

Nuestros resultados han logrado establecer el primer modelo del mecanismo de transducción inhibitorio que ocurre a nivel ciliar en neuronas olfatorias aisladas de *C. caudiverbera*. Además, han revelado la contribución de una corriente de  $K^+$  somática de efecto también inhibitorio.

### A. Mecanismo de transducción inhibitorio



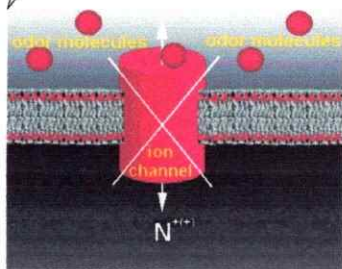
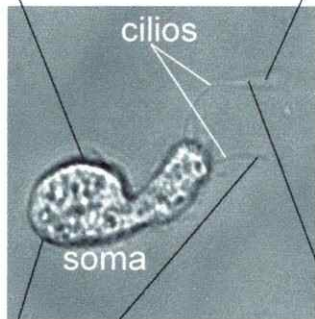
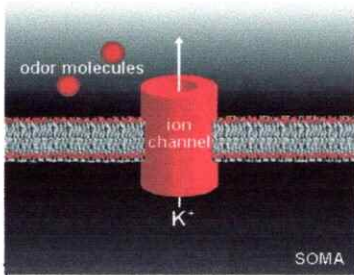
B. Activación directa de canales de  $K^+$  por odorantes pútridos en la membrana plasmática no ciliar

Figura 23

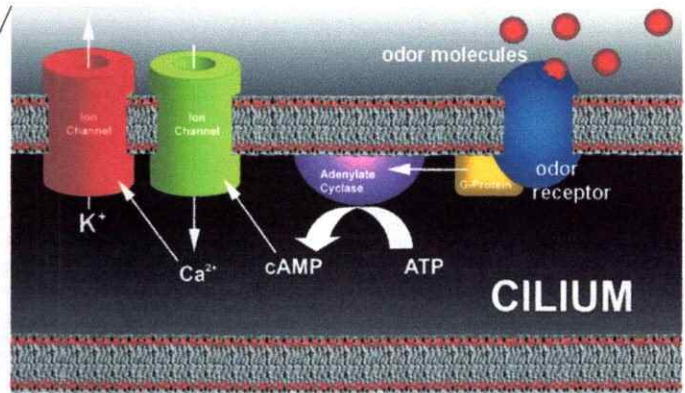


**Figura 23. Modelo propuesto para la respuesta inhibitoria a odorantes.** A. Los incrementos intraciliares de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por la activación de la CNGC pueden activar la conductancia inhibitoria de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  presente en los cilios olfatorios. B. Una vía alternativa, independiente de AMPc corresponde a la activación directa de corrientes de  $\text{K}^+$  por odorantes pútridos en la membrana no cilar de la NO.

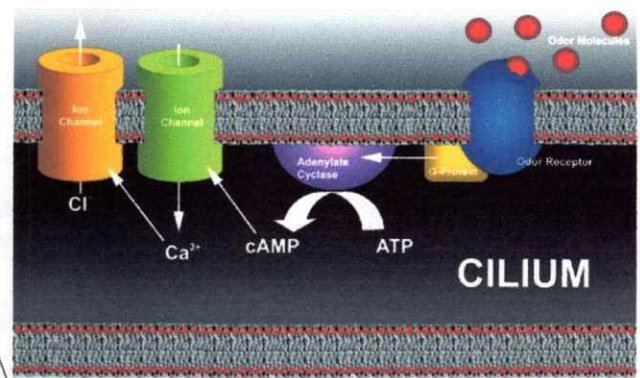
A. Activación directa de canales de  $K^+$  por odorantes pútridos en la membrana plasmática no ciliar.



B. Mecanismo de transducción inhibitorio



C. Mecanismo de transducción excitatorio



D. Supresión por odorantes de los canales de transducción y de los canales dependientes de potencial en la membrana plasmática de las NOs.

**Figura 24. Resumen del efecto de los odorantes en la NO aislada.** A. Los odorantes pútridos pueden activar canales de  $K^+$ , aparentemente de manera directa, en la membrana plasmática no ciliar. B. El mecanismo de transducción inhibitorio involucra incrementos intraciliares de  $Ca^{2+}$  producto de la activación de la conductancia CNGC dependiente de AMPc. C. El mecanismo de transducción excitatorio involucra la producción de AMPc y la activación de la CNGC y una conductancia de  $Cl^-$  dependiente de  $Ca^{2+}$ . D. Los odorantes (especialmente los del grupo floral/frutal) pueden suprimir los canales de transducción y/o los canales dependientes de potencial en la membrana plasmática de las NOs.

## DISCUSIÓN

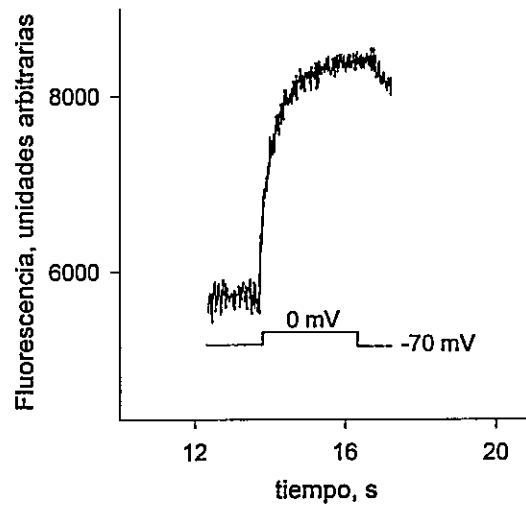
La existencia de la quimiotransducción inhibitoria en NOs de vertebrados ha sido bien documentada, pero hasta ahora su mecanismo permanecía virtualmente desconocido. Este trabajo de Tesis ha permitido generar el primer modelo de la inhibición en NOs. Investigamos el mecanismo de quimiotransducción inhibitorio, mediante la utilización de diversos tipos de estímulos odoríferos, agentes farmacológicos y la liberación intracelular de mensajeros secundarios, como  $\text{Ca}^{2+}$  y AMPc, desde compuestos enjaulados. Según nuestro modelo, un odorante se liga a su receptor proteico en la membrana del cilio olfatorio, lo que lleva a la activación de una proteína G que a su vez activa a la enzima adenilil ciclasa; el incremento en la actividad de esta enzima induce un aumento en los niveles intracelulares de AMPc, el que a su vez activa la CNGC. La activación de esta conductancia permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al cilio olfatorio, catión que subsecuentemente activa la corriente de  $\text{K}^+$  inhibitoria.

Nuestra primera evidencia directa de la activación de la corriente de  $\text{K}^+$  inhibitoria por incrementos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  se logró utilizando la herramienta del  $\text{Ca}^{2+}$  enjaulado. El  $\text{Ca}^{2+}$  liberado desde el compuesto jaula activó la conductancia de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  asociada a la respuesta inhibitoria y la conductancia de  $\text{Cl}^-$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  asociada a la respuesta excitatoria. En la gran mayoría de las NOs que carecen de

cilios olfatorios (80%), estas conductancias no se activan desenjaulando  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, en el 20% restante se observaron corrientes de cola y de salida, aunque de menor magnitud que en las células intactas; éstas corrientes pudieron deberse a que esas células conservaron pequeños segmentos de cilios olfatorios que no fueron detectados por la inspección visual. El hecho que en la gran mayoría (76%) de las células con cilios se observaran corrientes de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$ , muestra que ambas conductancias dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  residen en los cilios, donde está localizada la maquinaria de quimiotransducción. Zufall y colaboradores (2000) mostraron que los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  producidos por tapsigarguina (bloqueador de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico) en el soma de las NOs, no alcanzan a los cilios olfatorios. Estos depósitos estarían presentes en las NOs y se ha postulado que tendrían un papel en la amplificación de la respuesta a odorantes [Zufall *et al.*, 2000]. Si bien los cilios olfatorios carecen de organelos en su espacio luminal [Menco, 1994], en el botón dendrítico se han descrito estructuras vesiculares [Getchell y Getchell, 1992; Menco, 1994]. Cabe mencionar que hemos visto que el desarrollo de la corriente de  $\text{K}^+$  inhibitoria no se ve afectado por tapsigarguina, demostrando que esta respuesta es independiente de depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a esta droga (no mostrado).

Todos estos resultados están en concordancia con nuestra observación de que los pulsos de voltaje despolarizantes, utilizados en los protocolos diseñados para observar las corrientes activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado, no activaron las corrientes ciliares dependientes de este catión. Un pulso de voltaje despolarizante en una NO indujo un rápido incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, como lo muestra la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en NOs cargadas con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo 3 (Figura 25A) o Fura 2 (Figura 25C). Estas señales corresponden

A.



B.

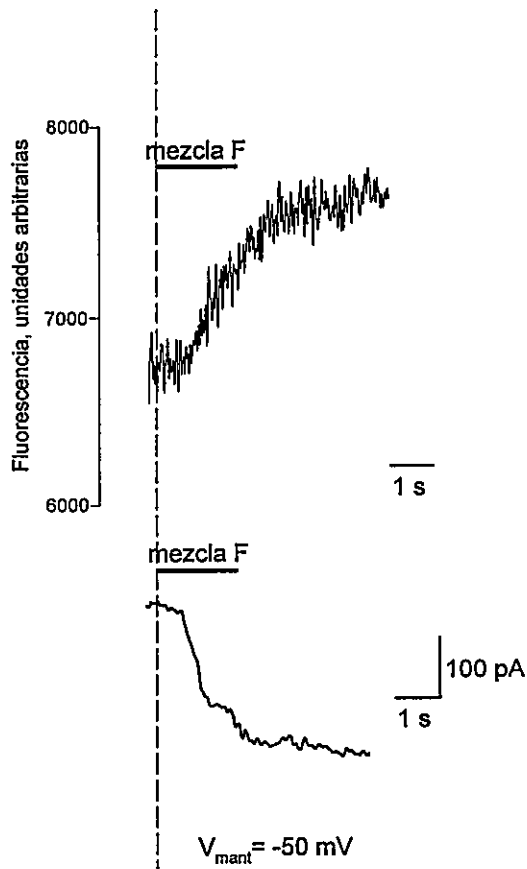


Figura 25

C.

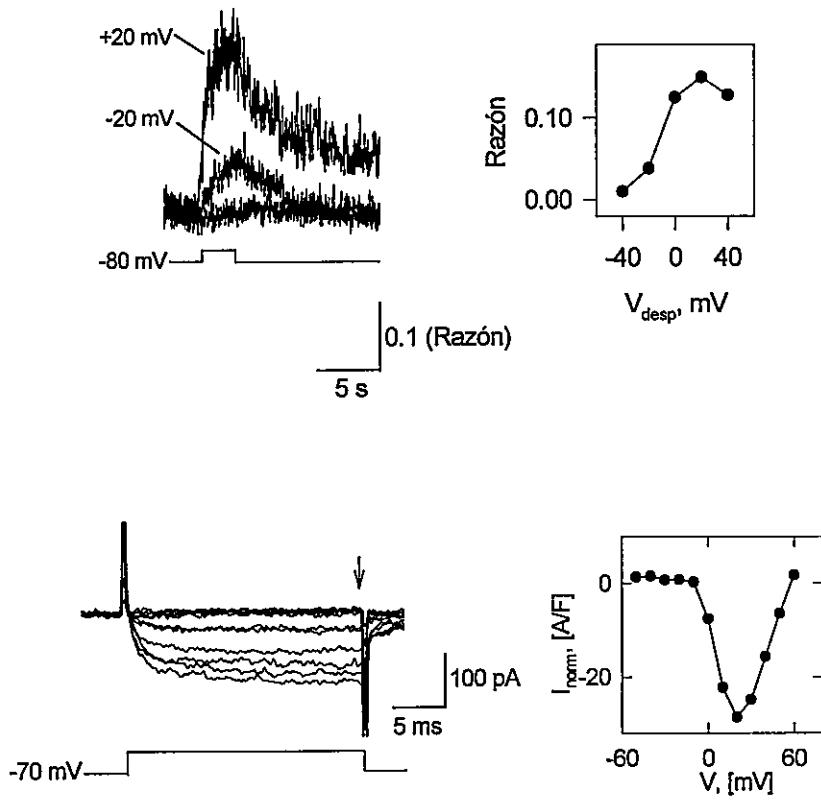


Figura 25

**Figura 25. Incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por despolarización y por la corriente excitatoria en NOs.** A. En la célula de la figura se observa un abrupto incremento en la intensidad de fluorescencia, asociada a un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre citoplásmico, cuando la NO es estimulada por un pulso de voltaje despolarizante a 0 mV. La célula fue cargada con 20  $\mu\text{M}$  Fluo 3 a través de la pipeta de “patch”, y la señal corresponde a la emisión recogida solamente en un área rectangular ( $\sim 50 \mu\text{m}^2$ ) que delimita el cuerpo de la neurona. B. Registro simultáneo de incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  asociados a la respuesta eléctrica a odorantes del tipo floral/frutal en una NO aislada bajo potencial controlado; la célula de la figura fue cargada con 20  $\mu\text{M}$  Fluo 3 a través de la pipeta de “patch” y la señal de fluorescencia corresponde a la emisión recogida en la región apical de la NO ( $\sim 25 \mu\text{m}^2$ ) durante la respuesta a odorantes. C. Cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (panel superior) y corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de potencial (panel inferior, medidas donde indica la flecha) en NOs de *Caudiverbera*. La neurona en C fue cargada con 50  $\mu\text{M}$  Fura 2 como indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  y la señal de fluorescencia corresponde a la emisión recogida en un área rectangular de  $\sim 50 \mu\text{m}^2$  que delimitó el cuerpo de la neurona.



solamente a la emisión recogida en un área rectangular que delimitó el cuerpo de la neurona. Este aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el soma celular es dependiente de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por potencial que se encuentra en la membrana plasmática no ciliar. No obstante el importante incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurre en una NO durante un estímulo despolarizante, las corrientes ciliares de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  no son activadas. Esto puede ser explicado por la existencia de una barrera para la difusión del  $\text{Ca}^{2+}$  desde la dendrita hacia los cilios olfatorios. Posiblemente, la barrera para el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  a los cilios sea el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , el que ha sido propuesto como la vía de salida del  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa al cilio durante una respuesta a odorantes [Reisert y Mathews, 1998]. Relacionado con lo anterior, observé que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el soma a partir de  $\text{Ca}^{2+}$  enjaulado no aumenta la magnitud de la corriente de salida que se activa por el pulso despolarizante, lo que inicialmente esperaba, debido a que la corriente mayoritaria en la membrana plasmática no ciliar corresponde a una corriente de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y activada por potencial [Figura 3; Madrid *et al.*, en preparación]. Posiblemente esto se deba a que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  alcanzada localmente a nivel de la membrana del soma, por la entrada del divalente durante un pulso despolarizante, sea considerablemente mayor que la que se alcanza al liberarse  $\text{Ca}^{2+}$  desde el compuesto jaula por luz UV. En este último caso, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel de la membrana producto de la despolarización sería suficiente para activar la corriente de  $\text{K}^+$  somática dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto no ocurre en los cilios porque éstos no tienen canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de potencial. Además, dado el pequeño volumen del lumen ciliar, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la jaula probablemente lleve con facilidad la concentración del

cación a varias decenas de milimolar en las cercanías de los canales [Morales *et al.*, 1997],  
 permitiendo su apertura.

**Tabla 1.**  
**Canales iónicos en la transducción de odorantes en *Caudiverbera*.**

Canal	Ligando activador	$K_{1/2}$	Conductancia	Bloqueable por	Localización en la NO	Referencias
CNG	AMPC	2,5 - 4,0 $\mu$ M	8 - 55 pS (40 pS estimado en <i>Caudiverbera</i> )	LY83583 $\mu$ M	Cilios y botón dendrítico	Larson <i>et al.</i> , 1997; Leinders-Zuffal y Zuffal, 1995; Schild y Restrepo, 1998; R. Delgado, comunicación personal
$K_{Ca}$ (i)	$Ca^{2+}$	46 $\mu$ M	220 pS	CTX nM	Cilios olfatorios	Jorquera <i>et al.</i> , 1995
$K_{Ca}$ (ii)	$Ca^{2+}$	80 $\mu$ M	210 pS	N.D.	Cilios olfatorios	Delgado <i>et al.</i> , 2001
$K_{Ca}$ (iii)	$Ca^{2+}$	20 $\mu$ M	60 pS	N.D.	"	"
$K_{Ca}$ (iv)	$Ca^{2+}$	1 $\mu$ M	11 pS	N.D.	"	"
$Cl_{Ca}$	$Ca^{2+}$	5 $\mu$ M	0.8 pS	DIDS $\mu$ M; ácido niflúmico $\mu$ M	Cilios olfatorios	Kleene y Gesteland, 1991; Esta Tesis
$K_{Ca}$ (v)	$Ca^{2+}$	N.D.	N.D.	TEA mM	Soma y dendrita	Delgado y Labarca, 1993; Madrid <i>et al.</i> , en preparación
$K_{rt}$	—	—	N.D.	TEA mM	Soma y dendrita	

**Tabla 1. Canales iónicos en la transducción de odorantes en *Caudiverbera*.** En esta tabla se muestra todos los canales candidatos a formar parte de las diferentes cascadas de transducción en el olfato de *Caudiverbera*.; **K<sub>Ca</sub> (x)**: canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> registrados en preparaciones de cilios olfatorios o por “patch-clamp” de estos mismos orgánulos [Jorquera *et al.*, 1995; Delgado *et al.*, 2000] **Cl<sub>Ca</sub>**: canal de Cl<sup>-</sup> activado por Ca<sup>2+</sup>; **K<sub>RT</sub>**: canal de K<sup>+</sup> tipo rectificadr tardío. K<sub>Ca</sub> (i) y K<sub>Ca</sub> (ii) podrían corresponder a la misma entidad molecular. **N.D**: No determinado.

**Tabla 2.**

**Las corrientes inhibitorias y sus propiedades.**

	Corriente inhibitoria a través de canales de K <sup>+</sup> ciliares	Corriente inhibitoria a través de canales de K <sup>+</sup> somáticos
Tiempo entre el inicio del estímulo y el comienzo de la respuesta	100 - 1000 ms	30 - 70 ms
Porcentaje de respuestas sobre el total de respuestas inhibitorias	20 %	80 %
Potencial de membrana al que se alcanza la máxima corriente	+20 mV	-30 mV
Bloqueable por	CTx nM; IbTx nM	N.D.
Activada por	Ca <sup>2+</sup>	odorantes pútridos, probablemente de modo directo

**Tabla 2: Corrientes inhibitorias y sus propiedades.** Tabla resumen con las características de las dos corrientes de K<sup>+</sup> inhibitorias presentes en la NO de *Caudiverbera*. **N.D:** No determinado.

Bajo condiciones de corriente controlada, el  $\text{Ca}^{2+}$  desenjaulado indujo una despolarización en algunas NOs o una hiperpolarización en otras. La magnitud de la respuesta fue dependiente del potencial de membrana de la célula para el caso de las respuestas despolarizantes (Figura 16A, panel derecho). Proponemos que la respuesta de la célula a determinado estímulo odorífero resulta del efecto neto de la activación de una corriente de  $\text{Cl}^-$  excitatoria y una corriente de  $\text{K}^+$  inhibitoria, las que tienen efectos eléctricos contrapuestos sobre el potencial de membrana, ya que la primera despolariza y la segunda hiperpolariza. Así, la respuesta neta de la célula dependería de la proporción de cada una de estas corrientes en cada caso.

Pero, ¿qué permite que las respuestas excitatorias e inhibitorias puedan coexistir como entidades independientes, siendo que comparten gran parte de los componentes de sus cascadas de transducción? y, más puntualmente, ¿cómo puede el incremento intraciliar de  $\text{Ca}^{2+}$  gatillar de manera independiente una respuesta excitatoria u otra inhibitoria, siendo que éste ocurre en la misma estructura celular: el cilio olfatorio?. Es posible que, como en otros sistemas de transducción de señales, en los cilios puedan existir microdominios donde tengan lugar incrementos muy localizados de  $\text{Ca}^{2+}$  durante un estímulo odorífero. Se ha reportado que los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  en varios sistemas celulares inducidos por entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  son extremadamente localizados, y el  $\text{Ca}^{2+}$  no difunde más allá de  $1\ \mu\text{m}$  [Neher y Augustine, 1992; Kasai, 1993]. Los canales activados por  $\text{Ca}^{2+}$ , podrían estar colocalizados con aquellos que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  como ocurre en otros sistemas celulares [Roberts, *et al.*, 1990; Robitaille, *et al.*, 1993]. Estos

microdominios estarían determinados por proteínas de andamio o de anclaje, como las descritas por ejemplo en el sistema visual de *Drosophila* [Tsunoda *et al.*, 1997]. Schreiber y colaboradores (2000) reportaron que una proteína (caveolina) podría estar mediando el ensamblaje de los complejos de señalización en los cilios de las NOs; es posible que ésta u otras proteínas de anclaje agrupen a los componentes de la cascada de transducción inhibitoria en dominios separados de los dominios de la cascada excitatoria. Esto explicaría que los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurren durante la respuesta excitatoria (Figura 23B) activen los canales de  $\text{Cl}^-$ , mientras los que ocurren en la respuesta inhibitoria (Figura 9) [Morales *et al.*, 1997] activen a los de  $\text{K}^+$ . Esta supuesta segregación de los mecanismos de transducción sería superado en ciertas circunstancias, como lo sugiere el hecho de que en algunos casos se ha observado la activación de ambas corrientes, inhibitoria y excitatoria, frente a un estímulo odorífero (Figura 18B) [Sanhueza *et al.*, 2000; Madrid y Bacigalupo, en preparación].

Hasta ahora no se ha estudiado sistemáticamente la posibilidad de que existan incrementos localizados de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a odorantes en microdominios. Leinders-Zufall y colaboradores (1997) determinaron que en respuesta a odorantes del tipo floral-frutal se desarrollan aumentos de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en todo el cilio (y en todos los cilios) de una neurona. No obstante, los autores mostraron que los incrementos de fluorescencia en los cilios olfatorios no son homogéneos, sino que aparecen fraccionados espacialmente. Sin embargo, ellos no estudiaron las causas de esta observación.

Una posibilidad alternativa a los microdominios es que ambas conductancias dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  se activen en toda respuesta a odorantes, pero que los canales de  $\text{K}^+$  tengan una afinidad mayor por el  $\text{Ca}^{2+}$  que los de  $\text{Cl}^-$  (por ejemplo el  $\text{K}_{\text{Ca}(\text{iv})}$  de la Tabla 1) y también la corriente total que ellos generen sea menor que la de  $\text{Cl}^-$  en cualquier potencial de membrana. De ser así, en la respuesta a los odorantes florales o frutales (que generan respuestas de mayor intensidad) el  $\text{Ca}^{2+}$  aumentaría a niveles suficientes para activar los canales de  $\text{K}^+$  y también los de  $\text{Cl}^-$ ; si estos últimos portan una mayor corriente, llevarán a la neurona a dar una respuesta excitatoria. Por el contrario, respuestas a odorantes que causen una menor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al cilio sólo activarán los canales de  $\text{K}^+$  provocando una respuesta inhibitoria. Mucho se puede especular sobre este punto, pero es necesario conocer la distribución, densidad y propiedades de los canales a lo largo del cilio olfatorio, para lograr una respuesta definitiva.

Si suponemos que la densidad de corriente de  $\text{K}^+$  en el cilio es menor que la de la corriente de  $\text{Cl}^-$ , como parece ser el caso por la menor corriente inhibitoria activada por liberación de AMPc o  $\text{Ca}^{2+}$  comparado con la corriente excitatoria a todos los valores de potencial de membrana donde hemos trabajado, esto se traduciría en una mayor frecuencia de respuestas excitatorias que inhibitorias en la NO. Esto estaría en concordancia con la observación que en sapos las respuestas inhibitorias registradas directamente del epitelio olfatorio son mucho menos frecuentes que las respuestas excitatorias [Duchamp-Viret, 2000; Díaz, *et al.*, Abstract AChemS 2001]. En contraste, en peces, las respuestas inhibitorias son varias veces más frecuentes que

las excitatorias [Kang y Caprio, 1995], también a nivel de registros extracelulares en el epitelio intacto, lo que hace a los peces un modelo interesante para estudiar inhibición a nivel de NOs aisladas. Sin embargo, es importante destacar que en peces la frecuencia basal de disparo de potenciales de acción de una NO registrada directamente en el epitelio es mayor que en sapos y mucho mayor que en ratas; por lo tanto, en estas últimas especies la probabilidad de encontrar respuestas inhibitorias podría estar subestimada, debido a que es necesaria una actividad eléctrica relativamente alta para distinguir inequívocamente una disminución de la frecuencia de disparo frente a un estímulo odorífero.

En el estudio de la activación de la corriente de  $K^+$  ciliar inhibitoria a través de incrementos controlados de AMPc en las NOs, utilizamos la estrategia de bloquear la corriente de  $Cl^-$  excitatoria y ver si era posible obtener una corriente de salida al potencial de inversión de las corrientes excitatorias, lo que así ocurrió. La importancia de este hallazgo es que es consistente con la idea que la activación de la cascada del AMPc puede traducirse en activación de la corriente de  $K^+$  inhibitoria. Estos experimentos pudieron realizarse, pero no sin dificultades, ya que, por ejemplo, el  $Ca^{2+}$  que entra por la CNGC bloquea estos canales haciendo muy difícil regular el incremento de  $Ca^{2+}$  en el cilio. Es importante señalar también que en el caso de la liberación de AMPc o de  $Ca^{2+}$  a partir de compuestos enjaulados las células tienden a sufrir un deterioro más rápido que el observado en condiciones normales de experimentación, esto es, bajo solución interna normal carente de estos compuestos. También, es común observar que las NOs, luego de haber sido expuestas en repetidas



ocasiones a pulsos de luz UV, desarrollan una corriente de fuga sostenida que corresponde en gran parte a una corriente de  $\text{Cl}^-$ , como lo demuestra su sensibilidad a ácido niflúmico ( $n= 3$ , no mostrado), la que probablemente corresponda a la conductancia ciliar de  $\text{Cl}^-$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto hace necesario que la exposición luminosa en cada célula sea la mínima necesaria, para evitar complicaciones en la interpretación de los resultados.

Las corrientes activadas por AMPc cíclico liberado desde un compuesto jaula presentan, a potenciales de mantención cercanos al potencial de reposo, una cinética en la fase inicial muy parecida a la de las corrientes excitatorias inducidas por odorantes (Figura 10A). Sin embargo, en algunos casos esta cinética inicial (u "onset" de la corriente) fue significativamente más rápida (2 de cada 10 NOs), como es predecible en una situación donde estamos activando directamente los canales de transducción por un incremento brusco en los niveles de AMPc y donde no es necesario el reclutamiento del resto de los componentes anteriores de la cascada de transducción sino sólo del canal de  $\text{Cl}^-$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  que, en estas células, es el responsable de la mayor parte de a corriente excitatoria (Figura 10C, panel derecho). Se han observado previamente respuestas rápidas a AMPc desenjaulado en NOs [Kurahashi y Menini, 1997]. La cinética relativamente lenta del desarrollo de esta corriente, que se observó en la mayoría de los casos, se debería posiblemente a que el estímulo luminoso que utilizamos en nuestros experimentos es menos intenso del necesario para llegar a una liberación más masiva del nucleótido, de modo que la

concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria para activar los canales de  $\text{Cl}^-$  se alcanzó gradualmente.

El estudio del efecto de bloqueadores que afectan la cascada de quimiotransducción mediada por AMPc (LY83583 y SQ22536) sobre la corriente de inhibición, nos permitió entender cómo podría activarse la corriente de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en los cilios olfatorios. En este punto hay que destacar que sólo en una fracción de las células (20%) la corriente de  $\text{K}^+$  activada por odorantes presentó sensibilidad frente a las drogas mencionadas. La fracción considerable de células que se mostró insensible a estas drogas no concordaba con nuestro modelo, sugiriendo la existencia de un mecanismo alternativo.

Encontramos que los odorantes pútridos son capaces de activar directamente una corriente de  $\text{K}^+$  en el soma celular. Esta corriente que estudiamos en NOs carentes de cilios es insensible a las drogas que afectan la cascada de transducción del AMPc. Además, su activación genera un potencial de receptor hiperpolarizante, semejante al observado cuando se activa la corriente de  $\text{K}^+$  ciliar. El desarrollo de esta corriente inhibitoria no ciliar es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  externo ( $n=3$ ) (no mostrado). Hasta ahora no se ha identificado la(s) conductancia(s) de  $\text{K}^+$  que se activa(n) en la membrana plasmática no ciliar en respuesta a odorantes. Dos candidatas obvias son la conductancia de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y la conductancia de  $\text{K}^+$  tipo rectificador tardío, ambas presentes en el soma. Podría también corresponder a un tercer canal de  $\text{K}^+$ , no descrito hasta ahora. La latencia en la activación de esta corriente somática es considerablemente menor que la de la corriente de transducción (30 - 70 ms, versus 100 - 1000 ms), lo que

argumenta a favor de la posibilidad que estos canales se activen por un mecanismo directo, independiente de una vía de transducción de señales.

La curva I-V de la corriente activada por odorantes pútridos en células sin cilios, construida con la diferencia entre la corriente obtenida en presencia y en ausencia de olor a diversos potenciales de mantención, presenta un máximo a  $\sim -30$  mV, bastante alejado del potencial al que se alcanza el máximo de la corriente de  $K^+$  ciliar (+20 mV). Si el canal responsable de la corriente somática activada por odorantes pútridos fuera uno de los canales de  $K^+$  conocidos de la membrana plasmática no ciliar, ésto podría deberse a que al aumentarse la magnitud de la despolarización aumenta la fracción de canales dependientes de potencial abiertos, disminuyendo el número de canales disponibles para ser abiertos por odorantes. Este efecto directo de los odorantes pútridos sobre los canales de  $K^+$  somáticos, como también el efecto de supresión de los odorantes sobre las conductancias dependientes de potencial [Sanhueza y Bacigalupo, 1999], serían los responsables de la sobreestimación que se tuvo en el porcentaje de respuestas inhibitorias observadas en NOs de *Caudiverbera* ( $\sim 35\%$  en Morales *et al.*, 1994), la que hoy estimamos en no mayor de 10% en células en reposo. Sin embargo, este número podría aumentar substancialmente en NOs cuya frecuencia de disparo de potenciales de acción ha sido aumentada por exposición a odorantes que las despolarizan. Esta situación es la que probablemente ocurre en la naturaleza, donde el epitelio olfatorio está expuesto con frecuencia a mezclas de odorantes.

¿Qué hace que un odorante pueda principalmente activar (pútrido) o suprimir (floral/frutal) directamente canales iónicos en la membrana del soma celular?. La

estructura química de los odorantes utilizados en esta Tesis (Figura 7) indica que los odorantes pútridos son en general más hidrofílicos que los odorantes florales/frutales. Se ha postulado que posiblemente estos últimos odorantes actúen particionándose en la membrana, como lo hacen algunos anestésicos locales [Sanhueza y Bacigalupo, 1999], interactuando con el canal y modificando sus propiedades, generando supresión. En el caso de los odorantes pútridos es posible que opere un mecanismo diferente; sin embargo, tal como en el caso de la supresión, su mecanismo de acción no ha sido establecido.

La posibilidad de que tanto las respuestas excitatorias como inhibitorias a odorantes sean mediadas AMPc y  $Ca^{2+}$ , como postula nuestro modelo, concuerda con la observación de que las NOs de ratones transgénicos, carentes del canal catiónico activado por nucleótidos cíclicos presentan electroolfatogramas sin respuestas a los estímulos odoríferos, siendo estos ratones a su vez anósmicos. Esto sugiere que la vía del AMPc sería la única maquinaria de quimiotransducción presente en NOs [Brunet *et al.*, 1996]. Ratones “knockout” para adenilil ciclasa III [Wong *et al.*, 2000] y para la proteína  $G_{olf}$  [Belluscio *et al.*, 1998] son también anósmicos, apoyando la idea de la existencia de una sola maquinaria de quimiotransducción en el olfato de los vertebrados.

Por muchos años, el  $InsP_3$  fue indicado como un posible mensajero secundario en la olfacción de los vertebrados [Breer *et al.*, 1990; Boekoff *et al.*, 1990; Okada *et al.*, 1994; Revisado en Schild y Restrepo, 1998]. Sin embargo, las evidencias acumuladas en el último tiempo sugieren que el  $InsP_3$  no sería indispensable para la respuesta a odorantes. Nuestras observaciones desenjaulando  $InsP_3$  en NOs muestran que el putativo

mensajero secundario activó corrientes de características irreproducibles en 3 de 10 células estimuladas (Figura 22A) y siempre con la muerte prematura de la neurona. No logramos ver una corriente dependiente de  $\text{InsP}_3$  en condiciones de estimulación no extremas, lo que sugiere que el efecto de  $\text{InsP}_3$  no sería el de mediador directo de una respuesta a odorantes. El liral y el lilial son dos odorantes que elevan los niveles de  $\text{InsP}_3$  en preparaciones de cilios de las NOs [Boekoff y Breer, 1990]; sin embargo, las respuestas eléctricas que éstos odorantes generan en las NOs no son diferentes de las observadas en respuesta a los odorantes [Chen *et al.*, 2000; Madrid y Bacigalupo, resultados no publicados] que elevan los niveles de AMPc en preparaciones de cilios olfatorios. De este modo, la proposición de que ciertos odorantes son transducidos a través de una vía dependiente de  $\text{InsP}_3$  aparece como muy poco probable.

Recientemente, se ha logrado registrar canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en parches de membrana de los cilios olfatorios de NOs de *Caudiverbera* y rata [Delgado *et al.*, Abstract AChemS, 2001]. También se han reportado canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a CTx en preparaciones de membranas de cilios de NOs obtenidas de *Caudiverbera*, utilizando la técnica de reconstitución de canales en bicapas planas lipídicas [Jorquera *et al.*, 1995]. Estas evidencias, junto a los resultados de esta Tesis apoyan fuertemente la idea de que estos canales están presentes en los cilios olfatorios de los vertebrados.

Los resultados presentados en esta Tesis clarifican el mecanismo subyacente a la respuesta inhibitoria a odorantes, y contribuyen de manera importante a la comprensión de la fisiología del olfato.

## CONCLUSIONES GENERALES

- Los odorantes pútridos activan la vía de quimiotransducción dependiente de AMPc en NOs.
- La activación de la vía del AMPc induce un aumento de la conductancia de  $K^+$  inhibitoria a través del incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  en los cilios olfatorios.
- Los odorantes pútridos pueden además activar, aparentemente de manera directa, una conductancia de  $K^+$  en la membrana plasmática no ciliar.
- Nuestras evidencias muestran que la respuesta inhibitoria involucra la activación de la vía del AMPc, pero es necesario considerar que la respuesta neta de la neurona podría incluir además la activación directa por odorantes pútridos de una corriente de  $K^+$  en la membrana plasmática no ciliar.

## REFERENCIAS

- ACHE B., 1994. Towards a common strategy for transducing olfactory information. *Cell Biology* 5: 55-63.
- ANHOLT, R., AEBI, U. Y SNYDER, S., 1986. A partially purified preparation of isolated chemosensory cilia from the olfactory epithelium of the bullfrog, *Rana catesbiana*. *J. Neurosci.* 6: 1962-1969.
- BACIGALUPO, J., MORALES, B., LABARCA, P., UGARTE, G., Y MADRID, R., 1997. Inhibitory responses to odorants in vertebrate olfactory neurons. In From ion channels to cell - to - cell conversation, 269-284. Edited by Latorre y Sáez, *Plenum Press, N.Y.*
- BELLUSCIO, L., GOLD, G., NEMES, A. Y AXEL, R., 1998, Mice deficient in  $G_{olf}$  are anosmic. *Neuron* 20: 69-81.
- BOEKHOFF, I. Y BREER, H. 1990. Differential stimulation of second messenger pathways by distinct classes of odorants. *Neurochem. Int.* 7: 553-557.
- BOEKHOFF, I., MICHEL, W.C., BREER, H. Y ACHE, B.W., 1994. Single odors diferentially stimulate dual second messenger pathways in lobster olfactory receptor cells. *J. of Neuroscience:* 14: 3304-3309.
- BOEKHOFF, I., TAREILUS, E., STROTMANN, J. Y BREER H., 1990. Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *EMBO J.* 9: 2453-2458
- BREER, H., BOEKHOFF, I. Y TAREILUS, E., 1990. Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature* 345: 65-68.
- BREER, H. Y BOEKHOFF, I. 1992. Second messenger signalling in olfaction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 439-443.

- BRUCH, R., KALINOSKI, D. Y KARE, M. 1988. Biochemistry of vertebrate olfaction and taste. *Ann. Rev. Nutr.* 8: 21-42.
- BRUNET, L.J., GEOFFREY, H.G. Y NGAI, J., 1996. General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* 17: 681-693.
- BUCK, L. Y AXEL, R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odorant recognition. *Cell.* 65: 175-187.
- CAPRIO, J. Y BYRD, R. 1984. Electrophysiological evidence for acidic, basic and neural amino acid olfactory receptor sites in the catfish. *J. Gen. Physiol.* 84: 403-422.
- CHEN, S., LANE, A.P., BOCK, R., LEINDERS-ZUFALL, T. Y ZUFALL, F. 2000. Blocking adenylyl cyclase inhibits olfactory generator currents induced by "IP(3)-odors". *J. Neurophysiol.* 84: 575-80
- DAWSON, T., ARRIZA, J., JAWORSKY, D., BORISY, F., ATTRAMADAL, H., LEFKOWITZ, S. Y RONNET, G., 1993. Beta-adrenergic receptor kinase-2 and beta-arrestin-2 as mediators of odorants induced desensitization. *Science* 259: 825-829.
- DELGADO, R. Y LABARCA, P., 1993. Properties of whole-cell currents in isolated olfactory neurons from the Chilean toad *Caudiverbera caudiverbera*. *Am. J. Physiol.* 264: C1418-C1427.
- DELGADO, R., SAAVEDRA, V., SIERRALTA, J. Y BACIGALUPO, J., 2001. Direct evidence for the presence of a Ca<sup>2+</sup> dependent K<sup>+</sup> channel in olfactory cilia. AChemS 2001 (Abstract)
- DHALLAN, R.S., YAU, K.-W., SCHRADER, K.A. Y REED, R.R. 1990. Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* 347: 184-187.
- DIAZ, J., MADRID, R. Y BACIGALUPO, J. 2001 Inhibitory odor responses recorded extracellularly from toad olfactory epithelium. AChemS 2001 (Abstract).
- DIONNE, V.E., 1992. Chemosensory responses in isolated olfactory receptor neurons from *Necturus maculosus*. *J. Gen. Physiol.* 99: 415-433.



DUCHAMP-VIRET, DUCHAMP, A., Y CHAPUT, MA. 2000. Peripheral odor coding in the rat and frog: quality and intensity specification. *J Neurosci.* 20:2383-90

DUVIN, A. Y DIONNE, V., 1994. Action potentials and chemosensitive conductance in the dendrites of olfactory neurosensory cells suggest new features for odor transduction. *J. Gen Physiol.* 103: 181-201.

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

FIRESTEIN, S., SHEPHERD, G.M. Y WERBLIN, F.S., 1990. Time course of the membrane current underlying sensory transduction in salamander olfactory receptor neurons. *J. Physiol. (London)* 430: 135-158.

FIRESTEIN, S. Y WERBLIN, F., 1987. Gated currents in isolated olfactory receptor neurons of the larval tiger salamander. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84: 6292-6296.

FIRESTEIN, S. Y WERBLIN, F., 1989. Odor induced membrane currents in vertebrate olfactory receptor neurons. *Science* 244:79-82.

FIRESTEIN, S., ZUFALL, F. Y SHEPHERD, G.M. 1991b. Single odor-sensitive channels in olfactory receptor neurons are also gated by cyclic nucleotides. *J. Neurosci.* 11: 3565-3572.

FRINGS, S. Y LINDEMANN, B., 1991. Current recording from sensory cilia of olfactory receptor cells in situ. The neuronal response to cyclic nucleotides. *J. Gen. Physiol.* 97: 1-16.

FRINGS, S., SEIFERT, R., GODDE, M. Y KAUPP, U.B., 1995. Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic-nucleotide-gated-channels. *Neuron* 15: 169-179.

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

GETCHELL, M. Y GETCHELL, T., 1992 Fine structural aspects of secretion and extrinsic innervation in the olfactory mucosa. *Microscopy research and technique.* 23: 111-127.

GOULDING, E.H., NGAI, J., KRAMER, R.H., COLICOS, S., AXEL, R., SIEGELBAUM, S.A. Y CHESS, A., 1992. Molecular cloning and single-channel properties of the cyclic nucleotide-gated channel from the catfish olfactory neurons. *Neuron*. 8: 45-58.

HAMILL, O.P., MARTY, E., SAKMANN, B. Y SIGWORTH, F.J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüegers Arch*. 391: 85-100.

HILLE, B., 1994. Ionic channels in excitable membranes. Sinauer, Sunderland, MA.

HUQUE, T. Y BRUCH, R.C., 1986. Odorant- and guanine nucleotide phosphoinositide turnover in olfactory cilia. *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 137: 36-42.

JORQUERA, O., LATORRE, R. Y LABARCA, P., 1995. Ion channels classes in the ciliary membrane of olfactory neurons: Planar lipid bilayer studies. *Am. J. Physiol*. 38: C1235-C1244

JONES, D.T. Y REED, R.R., 1989.  $G_{olf}$ : An olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science*. 244: 790-795.

KANDEL, E., SCHWARTZ, J. Y JESSEL, T., 2000. Principles of neural science. Fourth Edition. McGraw-Hill Ed.

KANG, J. Y CAPRIO, J., 1995. In vivo responses of single olfactory receptor neurons in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Neurophysiol* 73: 172-177

KASAI, H., 1993. Cytosolic  $Ca^{2+}$  gradients,  $Ca^{2+}$  binding proteins and synaptic plasticity. *Neurosc. Res*. 16: 1-7.

KAWAI, F., KURAHASHI, T., Y KANEKO, A. 1997. Nonselective suppression of voltage-gated currents by odorants in the newt olfactory receptor cells. *J. Gen. Phys.* 109: 265-272.

KLEENE, S. Y GESTELAND, R., 1991. Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J. of Neuroscience* 11: 3624-3629.

KRAMER, R.H. Y SIEGELBAUM, S.A., 1992. Intracellular  $Ca^{2+}$  regulates the sensitivity of cyclic nucleotide-gated channels in olfactory receptor neurons. *Neuron* 9: 897-906.

KURAHASHI, T., 1989. Activation by odorants of cation-selective conductance in the olfactory receptor cell isolated from the newt. *J. Physiol. (London)*, 419:177-192.

KURAHASHI, T., 1990. The response induced by intracellular cyclic AMP in isolated olfactory receptor cells of the newt. *J. Physiol. (London)* 430: 355-371.

KURAHASHI, T. Y MENINI, A., 1997. Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell. *Nature* 385: 725-9.

KURAHASHI, T. Y SHIBUYA, T., 1990.  $Ca^{2+}$ -dependent adaptive properties in the solitary olfactory receptor cell of the newt. *Brain Res.* 515: 261-8.

KURAHASHI, T. Y YAU, K.-W. 1993. Co-existence of cationic and chloride components of odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor neurons. *Nature* 363:71-74.

KURIHARA, K. Y KOYAMA, N. 1972. High activity of adenylyl cyclase in olfactory and gustatory organs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48: 30-35.

LABARCA, P., SIMON, S.A. Y ANHOLT, R.H. 1988., Activation by odorants of a multistate cation channel from olfactory cilia. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 944-947.

LANCET, D., 1986. Vertebrate olfactory reception. *Ann. Rev. Neurosci.* 9: 329-355.

LANCET, D., 1991. Olfaction. The strong scent of success. *Nature* 351:275-276.

LARSSON HP, KLEENE SJ, LECAR H., 1997 Noise analysis of ion channels in non-space-clamped cables: estimates of channel parameters in olfactory cilia. *Biophys J.*, 72:1193-203.

LEINDERS-ZUFALL, T. Y ZUFALL, F., 1995. Block of cyclic nucleotide-gated channels in salamander olfactory receptor neurons by the guanylyl cyclase inhibitor LY83583. *J. Neurophysiol.*, 74:2759-62.

LEINDERS-ZUFALL, T., RAND, M., SHEPHERD, GM., GREER, C.A. Y ZUFALL, F., 1997. Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics. *J. of Neuroscience* 17: 4136-48.

LEINDERS-ZUFALL, T., GREER, C.A., SHEPHERD, G.M. Y ZUFALL, F. (1998) Imagin odor-induced calcium transients in single olfactory cilia: specificity of activation and role in transduction. *J. of Neuroscience* 18:5630-5639

LOWE, G. Y GOLD, G.H. 1993. Non linear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature*, 366: 283-6

LUCERO M, HARRIGAN F Y GILLY W., 1992. Electrical responses to chemical stimulation of squid olfactory receptor cells. *J. Exp. Biol.* 162: 231-249.

LUDWIG, J., MARGLIT, T., EISMANN, E., LANCET, D. Y KAUPP, U.B. 1990. Primary structure of a cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett.* 270: 24-29.

MADRID, R. Y BACIGALUPO, J., 2000. Putrid odorants can activate the cAMP dependent pathway in toad olfactory receptor neurons. *J. Physiol. (London)* 523: S116 (Abstract)

MADRID, R. ÁLVAREZ, O. Y BACIGALUPO, J., 2001. Tonic and phasic electrical activity in toad olfactory receptor neurons. *En preparación.*

MAUE, R. Y DIONNE, V. 1987. Patch-clamp studies of isolated mouse olfactory receptor neurons. *J. Gen. Physiol.* 90: 95-125.

MALNIC, B., HIRONO, J., SATO, T., Y BUCK, LB., 1999, Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96: 713-23

MENCO, B., 1994. Ultrastructural aspects of olfactory transduction and perireceptor events. *Semin. Cell Biol.* 5: 11-24.

MENEVSE, A., DODD, G. Y POYNTER, T. 1977. Evidence for the specific involvement of cyclic AMP in the olfactory transduction mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77: 671-676.

MICHEL, W.C. Y ACHE, B.W. 1992. Cyclic nucleotides mediate an odor-evoked potassium conductance in lobster olfactory receptor cells. *J. Neurosci.* 12: 3979-3984.

MIYAMOTO, T., RESTREPO, D. Y TEETER, J.H. 1992. Voltage-dependent and odorant-regulated currents in isolated olfactory receptor neurons of the channel catfish. *J. Gen. Physiol.* 99: 505-530.

MONTELL, C., 1999. Visual transduction in Drosophila. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15: 231-68.

MORALES, B., LABARCA, P. Y BACIGALUPO, J., 1995. A ciliary conductance sensitive to charybdotoxin underlies inhibitory responses in toad olfactory receptor neurons. *FEBS Lett.* 359: 41-44

MORALES, B., MADRID, R. Y BACIGALUPO, J., 1997 Calcium mediates the activation of the inhibitory current induced by odorants in toad olfactory receptor neurons. *FEBS Letters* 402: 259-264.

MORALES, B., UGARTE, G., LABARCA, P, Y BACIGALUPO, J., 1994. Inhibitory  $K^+$  currents activated by odorants in toad olfactory neurons. *Proc R Soc Lond B* 257: 235-242

MORRISON, E. Y CONSTANZO, R., 1990. Morfology of the human olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.* 297:1-13.

NAKAMURA, T. Y GOLD, G.H. (1987) A cyclic-nucleotide gated conductance in olfactory- receptor cilia. *Nature* 325: 442-444

NEVIT, G. Y MOODY, W., 1992. An electrophysiological characterization of ciliated olfactory receptor cells of the coho salmon *O. Kisutch*. *J. Exp. Biol.* 166: 1-17.

NEHER, E Y AUGUSTINE, G., 1992. Calcium gradients and buffers in bovine chomafine cells. *J. Physiol. (London)* 450: 273-301.

NGAI, J., DOWLING, M., BUCK, L., AXEL, R. Y CHESS A. 1993a. The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. *Cell.* 72: 657-666.

NGAI, J., CHESS, A., DOWLING, M., NECLES, N., MACAGNO, E. Y AXEL, R. 1993b. Coding of olfactory information: topography of odorant receptor expression in the catfish olfactory epithelium. *Cell.* 72: 667-680.

O'CONNELL, R.J. Y MOZELL, M.M., 1969. Quantitative stimulation of frog olfactory receptors. *J. Neurophysiol.* 32: 51-63.

OKADA, Y., TEETER, J.H. Y RESTREPO, D., 1994. Inositol 1,4,5-triphosphate-gated conductance in isolated rat olfactory neurons. *J. Neurophysiol* 2: 595-602

PACE, U., HANSKI, E., SALOMON, Y. Y LANCET, D. 1986. Odorant sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature* 316: 255-258.

- PUN, R., KLEENE, S. Y GESTELAND R. 1994. Guanine nucleotides modulate steady-state inactivation of voltage-gated sodium channels in frog olfactory receptor neurons. *J. Membr. Biol.* 142: 103-111.
- REISERT, J. Y MATHEWS, HR. 1998 Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> extrusion governs response recovery in from olfactory receptor cells. *J. Gen. Physiol.* 112: 529-535
- RESSLER, K., SULLIVAN, S. Y BUCK, L. 1993. A zonal organization de odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell.* 73: 597-609
- RESTREPO, D., BOEKHOFF, I. Y BREER, H. 1993. Rapid kinetic measurements of second messenger formation in olfactory cilia from channel catfish. *Am. J. Physiol.* 264: C906-C911.
- RESTREPO D, TEETER J, Y SCHILD D., 1996. Second messenger signaling in olfactory transduction. *J. of Neurobiology.* 30: 37-48.
- RESTREPO, D., TEETER, J.H., HONDA, E., BOYLE, A.G., MARECEK, J.F., PRESTWICH, G.D. Y KALINOSKI, D.L. 1992. Evidence for an InsP<sub>3</sub>-gated channel protein in isolated rat olfactory cilia. *J. Physiol.* 263: C667-C673.
- RHEIN, L.D. Y CAGAN, R.H. 1980. Biochemical studies of olfaction: isolation, characterization and odorant binding activity of cilia from rainbow trout olfactory rosettes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77: 4412-4416.
- RHEIN, L.D. Y CAGAN, R.H. 1983. Biochemical studies of olfaction: binding specificity of odorants to cilia preparation from rainbow trout olfactory rosettes. *J. Neurochem.* 41: 569-577.
- ROBERTS, W.M., JACOBS, R.A. Y HUDSPETH, A.J., 1990, Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *J Neurosci.* 10: 3664-84
- ROBITAILLE R, GARCIA ML, KACZOROWSKI GJ, Y CHARLTON MP., 1993. Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* 11: 645-55
- RONNETT G, CHO H, LESTER L, WOOD S Y SNIDER, S., 1993. Odorants differentially enhance phosphoinositide turnover and adenylyl cyclase in olfactory receptor neuronal cultures. . *J. Neurosci.* 13: 1751-1758.

SANHUEZA, M. Y BACIGALUPO, J. 1999. Odor suppression of voltage-gated currents contributes to the odor-induced response in olfactory neurons. *Am. J. Physiol. 277 (Cell Physiol.):* C1086-C1099.

SANHUEZA, M., SCHMACHTENBERG, O. Y BACIGALUPO, J. 2000. Excitation, inhibition and suppression by odors in isolated toad and rat olfactory receptor neurons. *Am. J. Physiol. 279 (Cell Physiol.):* C31-C39.

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

SCHILD, D. Y RESTREPO, D. 1998. Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol. Rev. 78:*429-466.

SCHILD, D., JUNG, A. Y SCHULTENS, H. 1994. Localization of calcium entry through calcium channels in olfactory receptor neurons using a LASER scanning microscope and calcium indicator dyes Fluo-3 and Fura Red. *Cell Calcium 15:* 341-348.

SCHREIBER, S., FLEISCHER, J., BREER, H. Y BOEKHOFF, I., 2000. A possible role for caveolin as a signaling organizer in olfactory sensory membranes. *J. Biol. Chem. 275:* 24115-24123.

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

SURROCA, A. Y WOLFF, D., 2000. Inositol 1,4,5-trisphosphate but not ryanodine-receptor agonists induces calcium release from rat liver Golgi apparatus membrane vesicles. *J. Membr. Biol. 177:* 243-9

TAREILUS, E., NOE, J. Y BREER, H., 1995. Calcium signals in olfactory neurons. *B.B. Acta 1269:* 129-138.

TROMBLEY, P. Y WESTBROOK, G., 1991, Voltage-gated currents in identified rat olfactory receptor neurons. *J. Neurosc. 11:*435-444.

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

TROTIER, D. Y MACLEOD, P. 1983. Intracellular recordings from salamander olfactory receptor cells. *Brain Res. 268:* 225-237.

TSUNODA, S., SIERRALTA, J., SUN, Y., BODNER, R., SUZUKI, E., BECKER, A., SOCOLICH, M., Y ZUKER, C.S., 1997. A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature* 388:243-9

VASSAR, R., NGAI, J. Y AXEL, R. 1993. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell*. 74: 309-318.

VODYANOY, V., MURPHY, R.B., 1983. Single-channel fluctuations in bimolecular lipid membranes induced by rat olfactory epithelial homogenates. *Science* 220: 717-719.

WONG, S.T., TRINH, K., HACKER, B., CHAN, G.C., LOWE, G., GAGGAR, A., XIA, Z., GOLD, G.H. Y STORM, D.R., 2000. Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* 27:487-97

ZUFALL, F., FIRESTEIN, S. Y SHEPHERD, G.M. 1991a. Analysis of single cyclic nucleotide-gated channels in olfactory receptor cells. *J. Neurosc.* 11: 3573-3580.

ZUFALL, F., SHEPHERD, G.M. Y FIRESTEIN, S. 1991b. Inhibition of the olfactory cyclic nucleotide gated ion channel by intracellular calcium. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 246: 225-230.

ZUFALL, F., FIRESTEIN, S. Y SHEPHERD, M., 1994. Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 577-607.

ZUFALL F, LEINDERS-ZUFALL T, Y GREER CA., 2000. Amplification of odor-induced calcium transient by store-operated calcium release and its role in olfactory signal transduction. *J. of Neurophysiol.* 83:501-512.