

UCH-FC
BioTecnología
B 125
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO



**“CONTRIBUCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES
DE CALCIO NCX Y PMCA EN LA REMOCIÓN DE
CALCIO EN LOS CILIOS OLFATORIOS DE RATA
DURANTE LA RESPUESTA A ODORANTE”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en
cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

KRIS ELLIOT BLANCHARD TAPIA

Dr. Juan Bacigalupo Vicuña

Director Seminario de Título

Santiago de Chile, Noviembre de 2013





INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. **Kris Elliot Blanchard Tapia**

“CONTRIBUCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE CALCIO NCX Y PMCA EN LA REMOCIÓN DE CALCIO EN LOS CILIOS OLFATORIOS DE RATA DURANTE LA RESPUESTA A ODORANTE”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Juan Bacigalupo Vicuña
Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dra. Magdalena Sanhueza Tohá
Presidente Comisión

Dr. Julio Alcayaga Urbina
Corrector

Juan Bacigalupo
M. Sanhueza
Julio Alcayaga

Un sello circular con el texto "FACULTAD DE CIENCIAS" en la parte superior, "BIBLIOTECA CENTRAL" en el centro y "U. DE CHILE" en la parte inferior, rodeado por dos estrellas.

Santiago de Chile, noviembre de 2013



Nací en la grandiosa ciudad de Iquique un día 2 de septiembre del año 1985. Crecí entre el mar y el desierto, entre Cavancha y el cerro Dragón. Mi infancia ocurrió en el barrio, en la iglesia, en la escuela República de Italia, el Trinity college, el colegio Adventista, entre los "pascueros" con sus carros alegóricos y los pasteros de la multicancha. A pesar de que en los primeros años de educación siempre sobresalí por sobre los demás, nunca me consideré superior al de al lado. Además, el primer lugar del curso y la correspondiente foto en el cuadro de honor, se fueron diluyendo a medida que los problemas económicos, la presión social del barrio, y las preocupaciones de la pre-adolescencia comenzaron a ser significativos en mi vida. Los dos primeros años de mi educación secundaria los pasé "estudiando" en el Liceo Benjamín Vicuña Mackenna y empacando en el supermercado Líder Santa Amalia. Los dos años restantes los pasé estudiando y carreteando en la Academia Tarapacá de Iquique. En todos estos lugares conocí a mis grandes amigos y lo pasé de maravilla.

Respecto a la ciencia, poco aprendí de ésta en el colegio, faltó pasión y vocación por parte de mis profesores (no en todos por supuesto). Luego, entré a estudiar Licenciatura en Química en la PUC, pero no me gustó la carrera ni la Universidad. Ingresé el Programa de Bachillerato en la Universidad de Chile, y por primera vez en la vida tuve una visión integral del mundo. Fue ahí donde comencé a apreciar la belleza del conocimiento y la libertad que éste conlleva. Además, fue en "Bachi" donde conocí a la maravillosa mujer que me acompaña hoy.

Posteriormente ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, y simultáneamente comencé a trabajar como profesor de ciencias en el colegio San Antonio de Colina, lugar en el que descubrí la belleza que implica el enseñar, y lo poco que vale el dinero en comparación a unos ojos de profundo asombro.

Durante mis años de Universidad viví en los hogares universitarios Mater dei (PUC), Juan Gómez Millas y Paulina Starr de Universidad de Chile. En ellos compartí con grandes personas, hice buenos amigos y me nutrí enormemente de los conocimientos e historias de vida de cada uno de ellos.

Con éste, ya son tres años los que llevo en el laboratorio de Fisiología Celular de la Facultad de Ciencias, aquí me he sentido cómodo y apoyado.

Hoy me siento feliz por las cosas que he logrado y también muy afortunado al poder disfrutar de mi trabajo haciendo investigación científica.

Dedico mi primer logro académico a mi hermano Israel.

Por caminar junto a mí en la vida y por su amor incondicional.



Mis sinceros agradecimientos a todos los integrantes del laboratorio que han aportado al desarrollo de mi formación profesional. A los profes: Juan, Ricardo, Magda, Julio, Cecilia, Osvaldo. Gracias por sus valiosos consejos, comprensión y paciencia. También quisiera agradecer a: Pablo, Fabián, Jorge, Daniel K, Daniel E, Yorka, Belén, Don Dani, Doña Jannette, Carlos, Casilda, Marcelo, Germán, Gabriela, Larissa, por su amistad y buena onda.

También quisiera agradecer a mis amigos: Jorge, Randall, René, Pauli, André, Betsy, Nico Sallato, Pelu y Chiquiturrrix, por el apoyo, consejos y energía que me han brindado durante nuestros años de amistad.

Mención Honrosa merece mi amiga Solecilla, por su ayuda y apoyo durante la carrera, sobre todo en los momentos en que no puse asistir a clases o pruebas, es decir, casi todo el tiempo.

Especial reconocimiento merecen mis padres (biológicos y no biológicos) por el enorme esfuerzo que han hecho para entregarme una buena educación. A mis hermanos Israel, Nathalie, y almendrita, por el inmenso amor y apoyo. A la Lita, por el cariño que me ha brindado y por aguantarme en su casa. Finalmente quisiera agradecer a mi hermosa y amada Sue, quien con su amor, paciencia, bondad y humildad, me demuestra día a día que un mundo mejor es posible.

I ÍNDICE

I.1 ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. ÍNDICE.....	6
I.1 ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	6
I.2 ÍNDICE DE TABLAS.....	7
I.3 ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
I.4 LISTA DE ABREVIATURAS Y DEFINICIONES.....	10
II. RESUMEN.....	11
III. ABSTRACT.....	12
IV. INTRODUCCIÓN.....	13
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
V.1 OBTENCIÓN DE EPITELIO OLFATORIO DE RATA INTACTO.....	17
V.2 SOLUCIONES PARA LOS REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	17
V.3 REGISTROS DE ELECTRO-OLFATOGRAMA (EOG).....	18
V.4 INHIBICIÓN DE LOS TRANSPORTADORES NCX Y PMCA.....	20
V.5 ANÁLISIS DE DATOS.....	21
VI. RESULTADOS.....	23
VI.1 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA FASE DE RELAJACIÓN DE LA RESPUESTA A ODORANTE.....	23
VI.2 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTADOR NCX SOBRE LA CINÉTICA DE RELAJACIÓN DE LA RESPUESTA.....	28
VI.3 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTADOR PMCA SOBRE LA CINÉTICA DE RELAJACIÓN DE LA RESPUESTA.....	32
VI.4 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN SIMULTÁNEA DE NCX Y PMCA SOBRE LA CINÉTICA DE RELAJACIÓN DE LA RESPUESTA.....	36
VII. DISCUSIÓN.....	46
VIII. CONCLUSIÓN.....	55
IX. REFERENCIAS.....	56
X. MATERIAL ANEXO.....	59

I.2 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de X^2 y resultados de la prueba F del ajuste exponencial simple y doble. (SM., significativamente mejor; ND., no hay diferencias).

Tabla 2. Valores de amplitud y constantes τ y C del ajuste exponencial simple a la fase de relajación de la respuesta a un pulso de odorante de 100 μM y 10 mM bajo condiciones control.

Tabla 3. Valores de amplitud y constantes τ y C del ajuste exponencial simple a la fase de relajación de la respuesta a un pulso de odorante de 100 μM y 10 mM bajo condiciones de inhibición simultánea de NCX y PMCA.

I.3 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo de la vía de transducción olfatoria de vertebrados.

Figura 2. Componentes principales de la estación de trabajo para la obtención de registros de electro-olfatograma (EOG).

Figura 3. Análisis cinético de la fase de relajación de la respuesta a odorante.

Figura 4. Amplitud de la respuesta para las distintas condiciones de inhibición.

Figura 5. Cambios en la concentración de odorante no afectan la cinética de relajación de la respuesta.

Figura 6. Cinética de relajación de la respuesta para las condiciones control (n=11) y de inhibición del transportador NCX (n=10).

Figura 7. Amplitud relativa de la respuesta a $t=5$ s y constante de tiempo τ del ajuste a una exponencial simple bajo condiciones control (n=11) y de inhibición de NCX (n=10).

Figura 8. Valores porcentuales de los parámetros V_1 , V_2 y C respecto de la amplitud total bajo condiciones control (n=11) y de inhibición de NCX (n=10).

Figura 9. Constantes de tiempo (τ_1 y τ_2) del ajuste a una exponencial doble bajo condiciones control (n=11) y de inhibición de NCX (n=10).

Figura 10. Cinética de relajación de la respuesta para las condiciones control (n=11) y de inhibición del transportador PMCA (n=8).

Figura 11. Amplitud relativa de la respuesta a $t=5$ s y constante de tiempo τ del ajuste a una exponencial simple bajo condiciones control (n=11) y de inhibición de PMCA (n=8).

Figura 12. Valores porcentuales de los parámetros V_1 , V_2 y C respecto de la amplitud total bajo condiciones control (n=11) y de inhibición de PMCA (n=8); [Ringer pH 9,8 (n=4) y Ringer + caloxina (n=4)].

Figura 13. Constantes de tiempo (τ_1 y τ_2) del ajuste a una exponencial doble bajo condiciones control (n=11) y de inhibición de PMCA (n=8); [Ringer pH 9,8 (n=4) y Ringer + caloxina (n=4)].

Figura 14. Cinética de relajación de la respuesta para las condiciones control (n=10) y de inhibición simultánea de los transportadores NCX y PMCA (n=9).

Figura 15. Amplitud relativa de la respuesta a t=5 s y constante de tiempo τ del ajuste a una exponencial simple bajo condiciones control (n=11), de inhibición de NCX (n=10) y de inhibición simultánea de NCX y PMCA (n=9).

Figura 16. Valores porcentuales de los parámetros V_1 , V_2 y C respecto de la amplitud total del ajuste exponencial doble bajo condiciones control (n=11) e inhibición de NCX (n=10), y valores de V y C del ajuste exponencial simple bajo condiciones de inhibición simultánea de NCX y PMCA (n=9).

Figura 17. Constantes de tiempo (τ_1 y τ_2) del ajuste a una exponencial doble bajo condiciones control (n=11) e inhibición de NCX (n=10), y constante τ del ajuste exponencial simple bajo condiciones de inhibición simultánea de NCX y PMCA (n=9).

Figura 18. Cambios en la concentración de odorante no afectan la cinética de relajación de la respuesta bajo condiciones de inhibición simultánea de NCX y PMCA.

Figura 19. Comparación de la cinética de relajación de la respuesta entre la condición control y las distintas condiciones de inhibición.

Figura 20. Valores porcentuales de los parámetros V y C del ajuste simple y V_1 , V_2 y C del ajuste doble respecto de la amplitud total, para todas las condiciones.

Figura 21. Constantes de tiempo τ del ajuste simple (inhibición simultánea), y τ_1 y τ_2 del ajuste doble, para todas las condiciones.

I.4 LISTA DE ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

NSO: Neurona sensorial olfatoria.

PMCA: *Plasma membrane Ca²⁺ ATPase.*

NCX: *Na⁺/Ca²⁺ exchanger.*

CNG: *Cyclic nucleotide-gated channels.*

G_{olf}: *Olfactory neuron specific-G protein.*

EOG: Electro-olfatograma.

ACIII: Adenilatociclasa de tipo III

Cl_{Ca}: Canal de cloruro activado por Ca²⁺.

K_{Ca}: Canal de potasio activado por Ca²⁺.

c1b1: Caloxina 1b1.

PR: Potencial de receptor.

PDE1C2: Fosfodiesterasa de tipo 1C2.

CaMKII: Quinasa activada por Ca²⁺/calmodulina tipo 2.

Solución Ringer: Nombre de una serie de soluciones salinas diseñadas con el propósito de imitar el medio extracelular de las células animales. Las concentración de cada reactivo, osmolaridad y pH pueden variar de acuerdo a la especie animal en estudio. Es llamada así en honor a Sydney Ringer, quien entre 1882 y 1885 descubrió que dicha solución es capaz de mantener latiendo el corazón de una rana fuera del cuerpo por un periodo considerable de tiempo. Si bien fue definida inicialmente para anfibios, en este texto y con fines de simplificación de la lectura, "Ringer" hará referencia a la solución adaptada para trabajar con células de mamífero, cuya composición se especifica en "Materiales y métodos".

II. RESUMEN

En los vertebrados, las neuronas sensoriales olfatorias responden a los odorantes a través de un aumento en los niveles de Ca^{2+} en sus cilios quimiosensoriales. El Ca^{2+} que ingresa a través de los canales dependientes de nucleótidos cíclicos (CNG), activa a los canales de cloruro dependientes de Ca^{2+} (Cl_{Ca}) generando una despolarización denominada "potencial de receptor" (PR). El Ca^{2+} además cumple un papel fundamental en la adaptación a odorante al reducir la afinidad de los canales CNG por AMPc y regular los niveles citoplasmáticos de este nucleótido. Estudios previos realizados en diferentes especies de vertebrados sugieren que la remoción del Ca^{2+} desde el cilio depende de la acción conjunta del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y de la Ca^{2+} -ATPasa (PMCA); no obstante, existe controversia respecto de la contribución relativa de cada transportador en esta tarea.

En este estudio, se investigó la contribución de estos transportadores mediante registros de campo en epitelio olfatorio de rata (EOG), bajo condiciones de inhibición individual o simultánea de ellos. Los resultados sugieren un rol preponderante del transportador NCX y una contribución minoritaria de la PMCA, cuya actividad se torna significativa sólo bajo condiciones de inhibición de NCX. Interesantemente, bajo condiciones de inhibición simultánea de los transportadores, aún se observa una relajación gradual de la respuesta, lo cual podría estar reflejando una inhibición parcial de los transportadores, y/o la contribución de otros mecanismos de remoción de Ca^{2+} como tampones endógenos o difusión hacia la dendrita.

III. ABSTRACT

Vertebrate olfactory sensory neurons respond to odorants increasing Ca^{2+} concentrations in their chemosensory cilia. Ca^{2+} enters through the cyclic nucleotide gated channels (CNG) and activates the Ca^{2+} -dependent Cl^- channels (Cl_{Ca}) causing a depolarization called "receptor potential" (PR). Ca^{2+} also plays an essential role in odor adaptation by reducing CNG channel affinity for cAMP and by decreasing cAMP levels. Previous studies in different vertebrate species suggest that the removal of Ca^{2+} from the cilium depends of the simultaneous activity of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) and the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA). However, there is a controversy regarding the individual contribution of each transporter to this task.

In this study, we investigated the contribution of these transporters under their individual or simultaneous inhibition through field records in the rat olfactory epithelium (EOG). The results suggest an important role of NCX and a minor contribution of the PMCA, whose activity becomes significant only under NCX inhibition. Interestingly, a gradual relaxation of the response is observed under simultaneous inhibition of transporters, perhaps reflecting partial inhibition and/or contribution of other mechanisms of Ca^{2+} removal as endogenous buffers or diffusion towards dendrite.

IV. INTRODUCCIÓN

La transducción sensorial olfatoria en vertebrados comienza con la unión del odorante a un receptor acoplado a proteína G (G_{olf}) en la membrana ciliar de las neuronas sensoriales olfatorias e involucra típicamente una despolarización de la membrana como consecuencia del aumento en los niveles de Ca^{2+} y Na^+ en el cilio (Figura 1). La subunidad alfa de la proteína G activa una adenilato ciclasa de tipo III (ACIII) generando un aumento en los niveles intraciliares de AMP cíclico. Esto gatilla la apertura de los canales CNG, permitiendo el ingreso de Na^+ y Ca^{2+} a favor de su gradiente electroquímica, y provocando en consecuencia una corriente despolarizante (Firestein y col, 1990; Firestein y Zufall, 1994). Adicionalmente, el aumento en los niveles de Ca^{2+} en el cilio gatilla la apertura de los canales de cloruro dependientes de Ca^{2+} (Cl_{Ca}), generando una amplificación de la despolarización como consecuencia de la salida de Cl^- a favor de su gradiente electroquímica. Esta última corriente da cuenta del 70-90% de la corriente total de transducción (Reisert y Matthews, 1998, 2001a; Antolin y Matthews, 2007). La despolarización generada constituye el llamado "potencial de receptor", el cual provoca en la neurona una respuesta que se caracteriza por un aumento en la frecuencia de generación de potenciales de acción (Kleene, 1993; Kurahashi y Yau, 1993; Lowe y Gold, 1993b).

El Ca^{2+} es un importante modulador en la transducción olfatoria, ya que además puede activar a los canales de K^+ Ca^{2+} -dependientes (K_{Ca}) y facilitar la salida de K^+ a favor de su gradiente electroquímica, generando así una hiperpolarización inhibitoria que provoca un descenso en la tasa de descarga (Morales y col, 1994; Vogler y Schild, 1999; Madrid y col, 2005). Adicionalmente, a través del complejo Ca^{2+} -calmodulina, el Ca^{2+} cumple un rol fundamental en la adaptación a odorante (Chen y Yau, 1994; Liu y

col, 1994; Kurahashi y Menini, 1997) reduciendo la afinidad de los canales CNG por AMPc (Chen y Yau, 1994), disminuyendo los niveles de AMPc intraciliar a través de la activación de la fosfodiesterasa PDE1C2 (Boris y col., 1992; Yan y col., 1995) y reduciendo la síntesis de AMPc mediante fosforilación del residuo ser-1076 de ACIII por CaMKII (Wayman y col., 1995; Leinders-Zufall y col., 1998).

Una vez que se genera el potencial de receptor, la polarización de la neurona se restablece dentro de un corto lapso de tiempo, y ésta queda en condiciones de responder a un nuevo estímulo. Lo anterior requiere la desactivación de la cascada de transducción, el cierre de los canales CNG y la disminución de la corriente de Cl⁻ como resultado del descenso en los niveles Ca²⁺, por lo que el retorno del Ca²⁺ a los niveles de pre-estímulo se torna fundamental.

Organelos celulares como el retículo endoplasmático y la mitocondria son capaces de secuestrar Ca²⁺ y disminuir los niveles de este catión. Sin embargo, las pequeñas dimensiones del cilio (~0,2 µm de diámetro y 5-250 µm de longitud) no permiten la existencia de compartimentos membranosos internos que puedan almacenar Ca²⁺ (Reese, 1965; Menco, 1997).

Una Ca²⁺-ATPasa en la membrana plasmática (PMCA) de alta afinidad ($K_m = 2-4$ nM) y baja capacidad de transporte (~10² Ca²⁺/s) (Carafoli y Brini, 2000), y un intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX) electrogénico (3Na⁺ : 1Ca²⁺), con una afinidad por Ca²⁺ 10 veces menor, y una capacidad de transporte hasta 50 veces mayor que PMCA (Blaustein y Lederer, 1999), son los transportadores de Ca²⁺ presentes en los cilios de estas neuronas, y se piensa que éstos dan cuenta de la remoción del Ca²⁺ que ingresa durante la respuesta. No obstante, existe controversia con respecto a la contribución relativa de cada transportador en esta tarea.

Hasta la fecha, la mayoría de las aproximaciones al problema se han basado principalmente en el análisis de la cinética de desactivación de los canales de Cl^- , ya que por su dependencia directa de Ca^{2+} , la disminución de la corriente a través de ellos refleja la progresiva disminución en la concentración intraciliar de este catión (Reisert y Matthews, 1998; Antolin y Matthews, 2007; Castillo y col., 2007). De esta manera, variaciones en el tiempo de relajación de la respuesta (cuantificadas como cambios en la constante de tiempo, τ), se han asociado con cambios en la capacidad de remoción de Ca^{2+} desde el cilio, y en consecuencia, como un reflejo de la actividad de los transportadores NCX y PMCA bajo distintas condiciones experimentales. Entre las técnicas electrofisiológicas utilizadas se cuentan: registros de célula completa bajo condiciones de fijación del voltaje (*whole-cell voltage clamp*) (Reisert y Matthews, 1998; Antolin y Matthews, 2007; Castillo y col., 2007); registros extracelulares en célula única (*suction pipette*) (Reisert y Matthews, 1998, 2001a; Antolin y Matthews, 2007), y registros de campo en epitelio olfatorio (EOG) (Stephan y col., 2012).

Para inhibir o anular la actividad de PMCA se han usado agentes farmacológicos o ratones *knock-out* para la isoforma 2 de esta proteína (Weeraratne y col., 2006), y para inhibir a NCX se ha reemplazado el Na^+ por Li^+ o colina ($\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}^+$) en la solución de baño. Si bien se ha logrado demostrar una robusta participación de NCX en la remoción del Ca^{2+} en algunas especies de vertebrados (Reisert y Matthews, 1998, 2001a; Antolin y Matthews, 2007), la demostración de un rol significativo de la PMCA ha sido más bien esquiva, ya que los métodos farmacológicos de inhibición que se han utilizado no permiten asegurar la ausencia de efectos inespecíficos sobre otras proteínas de la vía de transducción. A esto se suma la posibilidad de que las

aproximaciones experimentales y/o los criterios de análisis usados, pueden no ser capaces de detectar la contribución de este transportador en la remoción de Ca^{2+} .

El objetivo de esta memoria fue evaluar la contribución de los transportadores de Ca^{2+} durante la respuesta a odorante, mediante registros de campo en el epitelio olfatorio de rata (EOG) bajo condiciones de inhibición individual y simultánea de los transportadores NCX y PMCA. La inhibición de NCX se realizó aplicando sobre el epitelio una solución Ringer libre de Na^+ (Ringer-Li) (Reisert y Matthews, 1998); y la inhibición de PMCA se realizó aplicando Ringer alcalino (pH 9,8) (Benham y col., 1992; Schwiening y col., 1993) o mediante aplicación del péptido inhibidor caloxina-1b1 (c1b1), el cual ha sido diseñado para unirse selectivamente a los dominios extracelulares de PMCA (Pande y col., 2011).

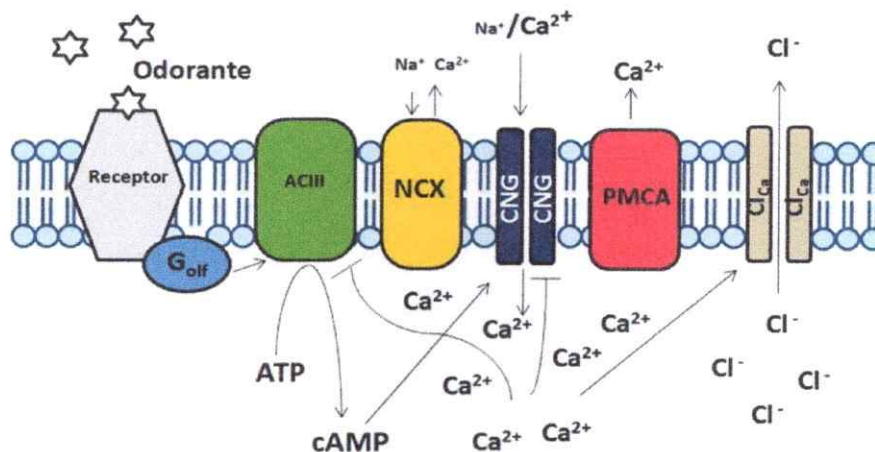


Figura 1. Esquema ilustrativo de la vía de transducción olfatoria de vertebrados.

La unión del odorante a su receptor provoca un aumento en los niveles de AMPc a través de la activación de ACIII mediada por la proteína G. El aumento de AMPc gatilla la apertura de CNG provocando la entrada de Na^+ y Ca^{2+} . El aumento de Ca^{2+} a su vez gatilla la apertura de los canales Cl_{Ca} , provocando la salida de Cl^- y activando los mecanismos regulatorios a través del complejo Ca^{2+} -calmodulina. La terminación de la respuesta requiere la remoción del Ca^{2+} por parte de los transportadores NCX y PMCA.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 OBTENCIÓN DE EPITELIO OLFATORIO DE RATA INTACTO.

Los experimentos se realizaron en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos, con un rango etario de 15 a 25 días. Los animales fueron mantenidos con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y libre disposición de agua y alimento. Estos fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ y posteriormente decapitados (Weeraratne y col., 2006). Se realizó un corte sagital de la cabeza a través de la línea media y se removió cuidadosamente el septum para exponer las turbinas del epitelio olfatorio. Se fijó un lado de la cabeza a una placa de cultivo con gel de agarosa al 3% (p/v) preparado en solución Ringer, y se mantuvo bajo un flujo constante de aire húmedo para evitar desecación. La otra mitad fue mantenida en Ringer a 4 °C para su posterior uso.

Todos los animales fueron manejados y sacrificados en concordancia a lo dispuesto por el comité de ética animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y en total acuerdo con los protocolos del NIH para procedimientos experimentales con animales.

V.2 SOLUCIONES PARA LOS REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.

Los reactivos utilizados para la preparación de las soluciones fueron adquiridos en MERCK o SIGMA. La osmolaridad de las soluciones utilizadas fue medida con un osmómetro (Advanced® Model 3250 Single-Sample Osmometer) y el valor de ésta se ajustó a 290 ± 10 mOsm mediante la adición de sacarosa. Las soluciones utilizadas se detallan a continuación:

- Ringer (en mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1 piruvato de sodio, 10 HEPES, 10 D-glucosa, pH 7,4.

- Ringer pH 9,8 (en mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1 piruvato de sodio, 10 HEPES, 10 D-glucosa, pH 9,8.
- Ringer-Li (en mM): 140 LiCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1 piruvato de sodio, 10 HEPES, 10 D-glucosa. El pH fue ajustado a 7,4 utilizando LiOH.
- Ringer-Li-pH 9,8 (en mM): 140 LiCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1 piruvato de sodio, 10 HEPES, 10 D-glucosa. El pH fue ajustado a 9,8 utilizando LiOH.
- Ringer-caloxina: el péptido c1b1 fue disuelto en solución Ringer a una concentración final de 160 µM.
- Ringer-Li + caloxina: el péptido c1b1 fue disuelto en Ringer-Li a una concentración final de 160 µM.

V.3 REGISTROS DE ELECTRO-OLFATOGRAMA (EOG)

Luego de fijar una mitad de la cabeza a la placa con agarosa, las turbinas del epitelio olfatorio fueron visualizadas con un estéreo-microscopio (Nikon SMZ-1) dispuesto en una jaula de Faraday para aislar el sistema de campos electromagnéticos que pudieran contaminar los registros de la actividad eléctrica del epitelio olfatorio. El electrodo de registro consistió en un alambre de Ag⁺/AgCl contenido en el interior de una pipeta de vidrio borosilicato (WPI, Inc) que se llenó hasta ¾ partes con solución Ringer. Esta pipeta fue construida estirando un capilar de vidrio con un estirador PC-10 (Narishige) hasta lograr un diámetro aproximado de 10 µm. El electrodo de referencia consistió de un alambre de Ag⁺/AgCl inserto en gel de la placa de cultivo. Ambos electrodos fueron conectados a un amplificador diferencial (Warner Instrument Corp., CT, USA, DP-301) con un filtro pasa-banda de 300-1000 Hz. El estímulo se generó

aplicando pulsos de N_2 a 10 psi de presión y 100 ms de duración sobre un recipiente con una solución del odorante isoamil acetato a 100 μM . El odorante fue expulsado en fase gaseosa hacia la superficie del epitelio a través de un tubo por el que constantemente circula aire húmedo para evitar la desecación del tejido. La señal eléctrica registrada mediante el amplificador se monitoreó a través de un osciloscopio (EZ Digital OS-5020G), y se digitalizó con un conversor Análogo/Digital (Scientific Solution, Inc.), el cual a su vez está conectado al computador que controla todo el sistema usando el Software pClamp7 (Axon Instruments, Inc) (Figura 2).

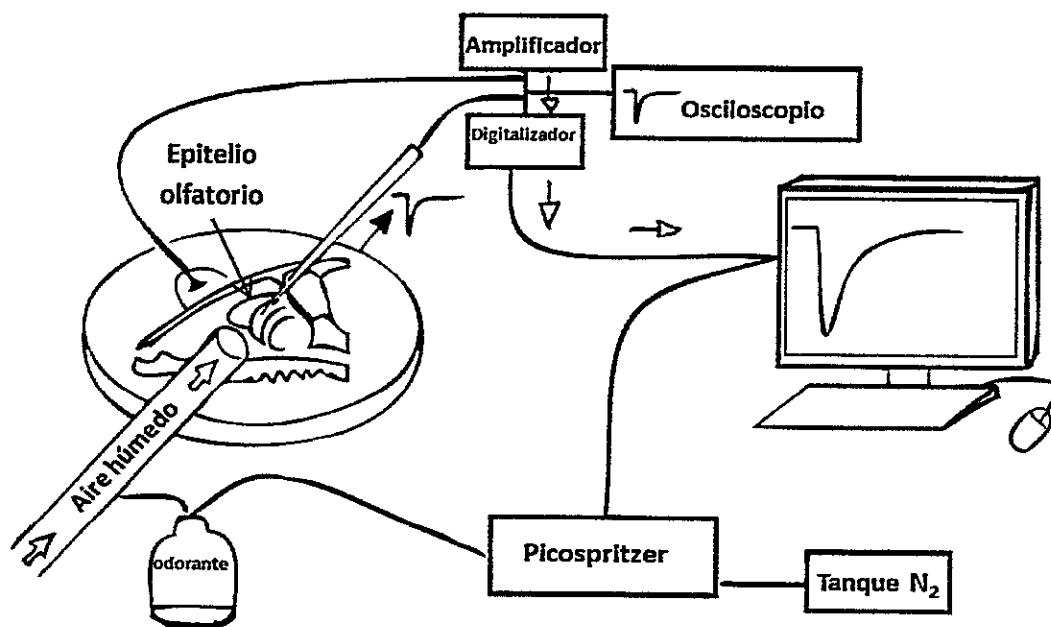


Figura 2. Componentes principales de la estación de trabajo para la obtención de registros de electro-olfatograma (EOG). Modificado de Cygnar y col. 2010.

V.4 INHIBICIÓN DE LOS TRANSPORTADORES NCX Y PMCA

Luego de localizar una región que produjera una respuesta eléctrica de amplitud mayor a 1,5 mV, se aplicó abundante solución Ringer (4-5 ml aprox.) sobre todo el epitelio con una pipeta Pasteur y se esperó por 3 minutos antes de volver a registrar. Para efectos de análisis, el primer registro luego de estos 3 minutos se consideró como registro control. La inhibición de los transportadores se llevó a cabo mediante la aplicación de distintas soluciones inhibitoras sobre la región del epitelio escogida previamente, y la respuesta se registró un minuto después. La inhibición del transportador NCX se realizó aplicando Ringer-Li, y la inhibición de la PMCA se realizó mediante la aplicación de caloxina 1b1 (160 μ M) o Ringer-pH 9,8 sobre el área precisa donde se posó el electrodo de registro. La doble inhibición se realizó mediante la aplicación de Ringer-Li + caloxina o Ringer-Li-pH 9,8.

En todos los animales utilizados se realizaron registros en las diferentes condiciones de inhibición mediante la aplicación secuencial de las distintas soluciones, y en el siguiente orden: Ringer, Ringer-Li, Ringer + caloxina/Ringer pH 9,8, Ringer-Li + caloxina/Ringer-Li pH 9,8. Antes y después de la adquisición de la respuesta bajo alguna de las condiciones de inhibición, se lavó el epitelio con abundante solución Ringer y se registró la respuesta con la finalidad de evaluar la recuperación de ésta (en términos cinéticos) en relación al registro control (evaluación posterior mediante análisis computacional). De esta manera, es posible asociar los cambios observados en la cinética de relajación de la respuesta con los efectos inhibitorios de las soluciones aplicadas. En los casos en que la amplitud de cualquiera de los registros cayó por debajo de los 0,25 mV, se dio por finalizado el experimento. No siempre fue posible registrar en todas las condiciones de inhibición (respuestas menores a 0,25 mV antes

de terminar la batería de soluciones). Por lo tanto, en algunos casos se cambió el orden en la secuencia de aplicación de las soluciones inhibitorias. En los ensayos de inhibición de PMCA, ya sea de inhibición individual o simultánea con NCX, se utilizó sólo uno de los métodos de inhibición (caloxina 1b1 o Ringer-pH 9,8). Todos los registros para un mismo animal fueron realizados en la misma zona del epitelio (sin mover el electrodo) con la intención de registrar el comportamiento eléctrico de la misma población de neuronas.

V.5 ANALISIS DE DATOS

Se determinaron los parámetros cinéticos de la respuesta al ajustar una exponencial simple $[V(t) = Ve^{(-t/\tau)} + C]$ o una doble $[V(t) = V_1e^{(-t/\tau_1)} + V_2e^{(-t/\tau_2)} + C]$ a la fase de relajación de la respuesta, mediante el software Igor Pro 6.03 (Wavemetrics).

Del ajuste exponencial simple, y en concordancia con los criterios descritos en la literatura pertinente, se calculó la constante de tiempo τ como un indicador indirecto de la capacidad de remoción de Ca^{2+} . Del ajuste exponencial doble se calcularon las constantes de tiempo τ_1 y τ_2 , las amplitudes V_1 y V_2 y el valor normalizado de la constante "C". Por otra parte, también se determinó la relación porcentual entre la amplitud a un tiempo $t=5$ segundos y la amplitud máxima (V_{min})¹ $[(V_{(t=5)}/V_{min}) \times 100]$ (parámetro al que se hace referencia en el texto como "amplitud relativa a $t=5$ s"). Estos dos últimos parámetros son indicadores de la capacidad de repolarización de la membrana, y pueden utilizarse como indicadores indirectos de la capacidad de remoción de Ca^{2+} . No obstante, dado que el parámetro "C" presentó un mayor nivel

¹ V_{min} denota la amplitud máxima de la respuesta (correspondiente al mínimo voltaje registrado), la cual en términos absolutos es levemente mayor que el valor de $V_{(t=0)}$, ya que el ajuste se realizó a partir de 100 ms del pico.

de dispersión en comparación a la amplitud relativa (en algunas ocasiones se observaron valores de "C" positivos), el análisis de los datos se realizó usando la amplitud relativa a $t=5$ s.

La significancia estadística de todos los parámetros fue calculada por pares mediante la prueba T de Student para dos grupos de observaciones con varianzas distintas (previo análisis de varianzas). La bondad de cada tipo de ajuste se monitoreó mediante el test Chi-cuadrado (χ^2), y las diferencias estadísticas en cuanto a calidad de ajuste se evaluaron mediante el test de Fisher.

VI. RESULTADOS

VI.1 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA FASE DE RELAJACIÓN DE LA RESPUESTA A ODORANTE.

En función de estudiar los parámetros cinéticos de la respuesta que pudieran proporcionar información relevante respecto de la actividad de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} , se determinaron las características cinéticas de la fase de relajación de la respuesta en registros de EOG.

En la Figura 3-A se muestra la respuesta control típica obtenida al estimular con un pulso de isoamil acetato a una concentración de 100 μM por 100 ms. Como se observa, la amplitud máxima (-2,9 mV) se alcanza en el orden de milisegundos (latencia= 81 ms y tiempo al pico= 249 ms) para luego decaer exponencialmente hacia la línea base. Esta última etapa constituye la fase de relajación de la respuesta, a la que es posible ajustar un modelo de decaimiento exponencial simple $[V(t) = Ve^{(-t/\tau)} + C]$ o doble $[V(t) = V_1e^{(-t/\tau_1)} + V_2e^{(-t/\tau_2)} + C]$.

Con la intención de determinar si el ajuste a una doble exponencial es estadísticamente mejor que el ajuste a una simple, se realizó la prueba F de Fisher entre los resultados obtenidos al ajustar la fase de relajación de la respuesta control promedio (n=11). En la Figura 3-B se muestra este registro normalizado y superpuesto con los ajustes simple (trazo azul) y doble (trazo rojo), cuyas funciones son $[V(t) = -0,88e^{(-t/846)} - 0,04]$ y $[V(t) = -0,67e^{(-t/662)} - 0,29e^{(-t/1920)} - 0,004]$ respectivamente². Adicionalmente se calculó la amplitud relativa al pico de la respuesta a un tiempo $t=5$ s. Este último parámetro, al igual que la constante τ , refleja la rapidez de relajación de la

² Dado que el ajuste se realizó 100 ms luego del pico de amplitud, la evaluación de estas funciones en $t=0$ no arroja el valor esperado de -1. Sin embargo dado que los ajustes se realizaron desde el mismo punto temporal, es posible usar los parámetros derivados de ellos para realizar el análisis.

respuesta hacia la línea base, de manera que ambos pueden utilizarse como indicadores relativos de los niveles de Ca^{2+} durante la respuesta.

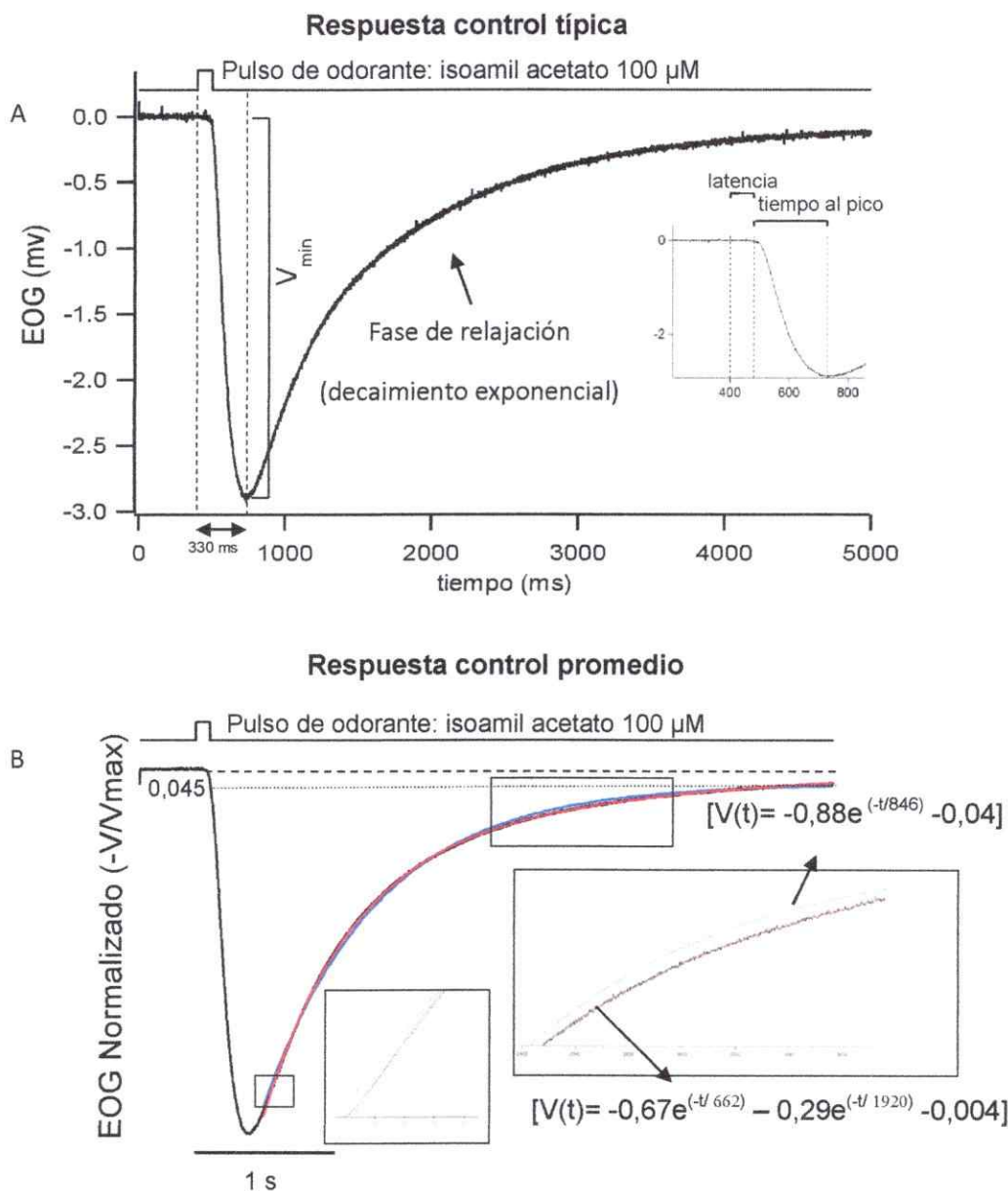


Figura 3. Análisis cinético de la fase de relajación de la respuesta a odorante. (A) Respuesta control representativa a un pulso de isoamil acetato $100 \mu\text{M}$ por 100 ms . (B) Respuesta control promedio normalizada ($n=11$). Se ajustó la fase de relajación (desde 100 ms a partir de V_{min}) a una exponencial de tipo simple (trazo azul) o doble (trazo rojo). El trazo horizontal discontinuo superior (-----) representa la línea base, y el trazo discontinuo inferior (.....) el valor de amplitud de la respuesta a $t=5$ segundos; el cual en este caso corresponde al 4,5% de la amplitud máxima.

Este análisis cinético fue realizado para todas las condiciones de inhibición testeadas. En la Tabla 1 se muestran los valores del parámetro Chi-cuadrado (X^2) derivados del ajuste y los resultados de la prueba F. En ella se observa que para las condiciones control y de inhibición individual de NCX o PMCA, se obtienen menores valores de X^2 (y en consecuencia mejores niveles de ajuste) al utilizar un modelo de dos componentes. Además, la prueba F indica que estas diferencias son estadísticamente significativas. Esto sugiere que bajo estas condiciones experimentales, existen a lo menos dos mecanismos diferenciables en términos cinéticos que estarían implicados en la relajación de la respuesta (los detalles de cada condición se analizan más adelante).

Tabla 1. Valores de X^2 y resultados de la prueba F del ajuste exponencial simple y doble. (SM., significativamente mejor; ND., no hay diferencias)

Tratamiento	X^2		test F
	Ajuste simple	Ajuste doble	
Ringer	0,94	0,02	SM
Ringer-Li	0,72	0,14	SM
Ringer pH 9,8	0,46	0,18	SM
Ringer-Li- pH 9,8	0,13	0,13	ND
Caloxina	0,28	0,08	SM
Ringer-Li + caloxina	0,25	0,25	ND

En todos los experimentos la amplitud de la respuesta tendió a disminuir considerablemente luego de la aplicación de cualquier tipo de solución sobre el epitelio olfatorio (incluyendo Ringer), de modo que la aplicación secuencial de éstas generó una disminución progresiva de este parámetro en el tiempo (quizás como consecuencia de la muerte celular progresiva). En el mejor de los casos se obtuvieron respuestas mayores a 0,25 mV hasta 40 minutos después de realizar el primer registro

(sin cambiar la posición del electrodo o aumentar la concentración de odorante). En la Figura 4 se muestran los valores de amplitud para las distintas condiciones testeadas. Dado que la amplitud disminuyó progresivamente en el tiempo, y considerando que el orden de aplicación de las soluciones inhibitoras no siempre fue el mismo (ver Materiales y Métodos), no es posible correlacionar certeramente los valores de amplitud de la respuesta con las condiciones de inhibición en las cuales estas fueron adquiridas. No obstante, para los registros realizados en un mismo animal y adquiridos bajo las mismas condiciones experimentales, no se observaron diferencias en la cinética de relajación entre respuestas con distintas amplitudes. En la Figura 5-A se muestra el resultado de un experimento bajo condiciones control en donde luego de la obtención de un registro de baja amplitud (-0,85 mV) (probablemente como consecuencia de la disminución en la cantidad de NSO que respondieron), se incrementó drásticamente el valor de ésta (hasta -4,1 mV) al aumentar la concentración del odorante (100 μ M a 10 mM) con la finalidad de activar a un mayor número de receptores en cada neurona, y a un mayor número de neuronas en el epitelio. En la Figura 5-B se muestran ambos registros normalizados y superpuestos. Se observa que si bien existe una gran diferencia en los valores de amplitud, no hay mayores diferencias en la cinética de relajación (Tabla 2).

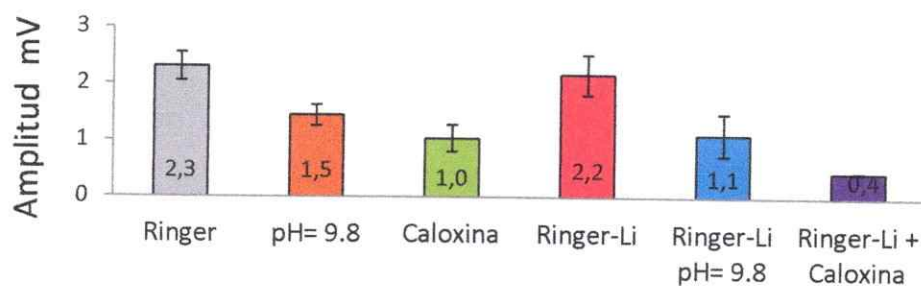


Figura 4. Amplitud de la respuesta para las distintas condiciones de inhibición.
Valores promedios \pm SEM

Tabla 2. Valores de amplitud y constantes τ y C del ajuste exponencial simple a la fase de relajación de la respuesta a un pulso de odorante de 100 μM y 10 mM bajo condiciones control.

[isoamil acetato]	V_{\min} (mV)	τ (ms)	Constante C
100 μM	-0,843	462,4	-0.05
10 mM	-4,068	497,3	-0.11

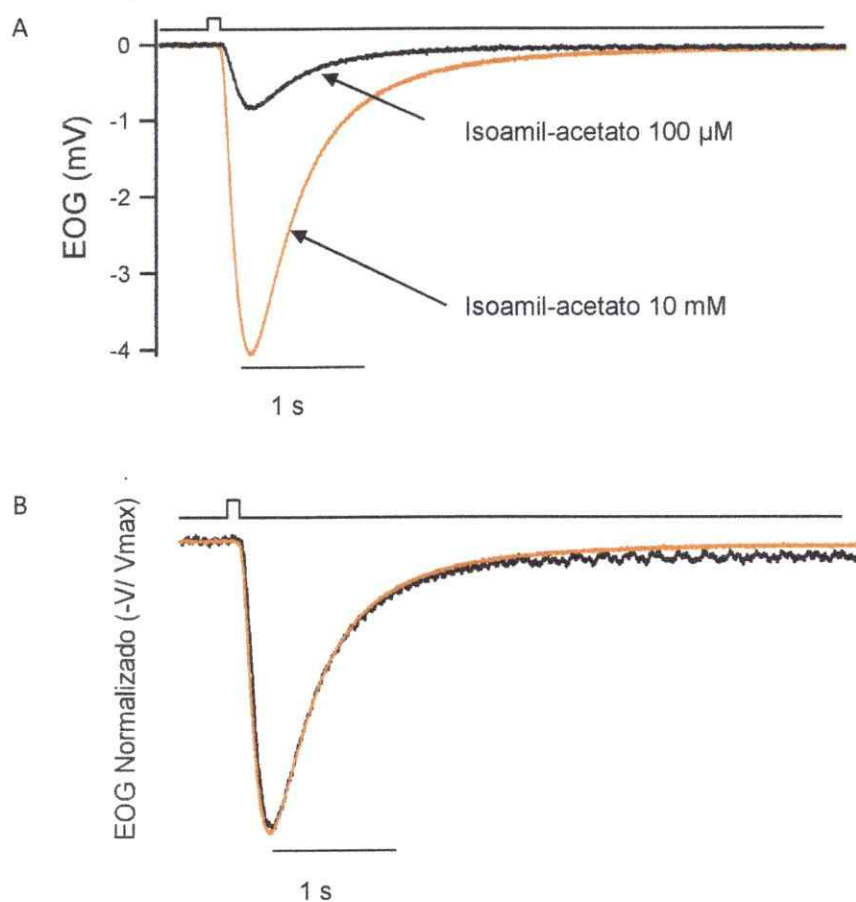


Figura 5. Cambios en la concentración de odorante no afectan la cinética de relajación de la respuesta. Efectos de la concentración de odorante sobre la cinética de relajación de la respuesta bajo condiciones control. En la misma rata se cambió drásticamente la concentración de odorante de 100 μM a 10 mM y se registró la respuesta. (A) Superposición de los registros adquiridos con las dos concentraciones usadas. (B) Superposición de los mismos registros normalizados.

VI.2 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTADOR NCX SOBRE LA CINÉTICA DE RELAJACIÓN DE LA RESPUESTA.

Con la finalidad de analizar la participación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la remoción de Ca^{2+} durante la respuesta, se llevaron a cabo registros bajo condiciones de inhibición de su actividad mediante la aplicación de solución Ringer-Li sobre el epitelio olfatorio. En la Figura 6 se muestran los registros control (n=11) y de inhibición de NCX (n=10) promediados y normalizados. El ajuste de la fase de relajación de la respuesta a una exponencial simple mostró un aumento significativo en el valor de la constante de tiempo τ (de $0,9 \pm 0,1$ s a $1,3 \pm 0,1$ s) cuando se expuso el epitelio olfatorio a una solución libre de sodio. Por otra parte, el valor de amplitud relativa de la respuesta a $t=5$ s, aumento de $4,5\% \pm 0,8$ a $20,4\% \pm 2,9$, evidenciándose de esta manera una recuperación incompleta de la respuesta en estas condiciones (Figura 7).

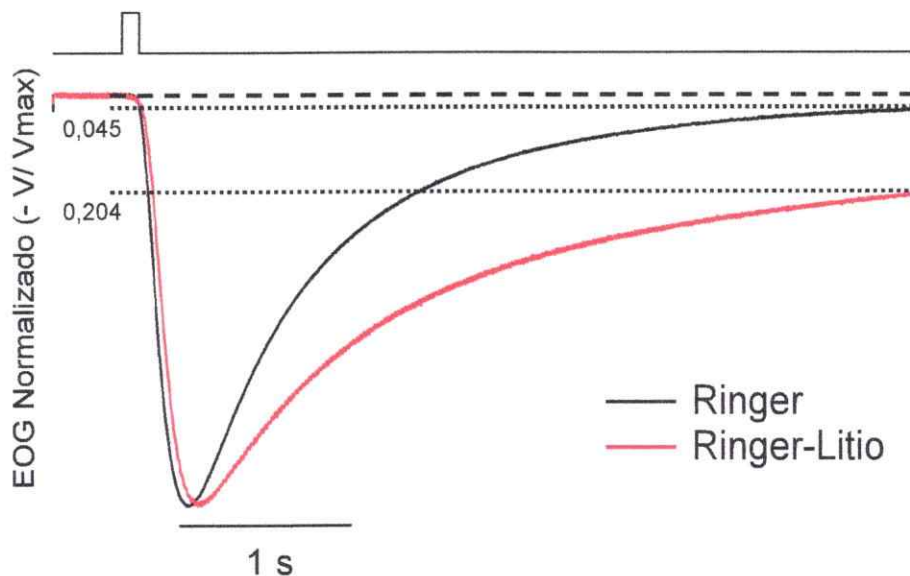


Figura 6. Cinética de relajación de la respuesta para las condiciones control (n=11) y de inhibición del transportador NCX (n=10). Respuestas promedio normalizadas y superpuestas; condición control (trazo negro); condición de inhibición de NCX (trazo rojo). El trazo horizontal discontinuo superior representa la línea base, y los trazos inferiores indican el valor de amplitud de la respuesta a $t=5$ segundos; que en este caso corresponden al 4,5% (control) y 20,4% (Ringer-Li) de la amplitud máxima.

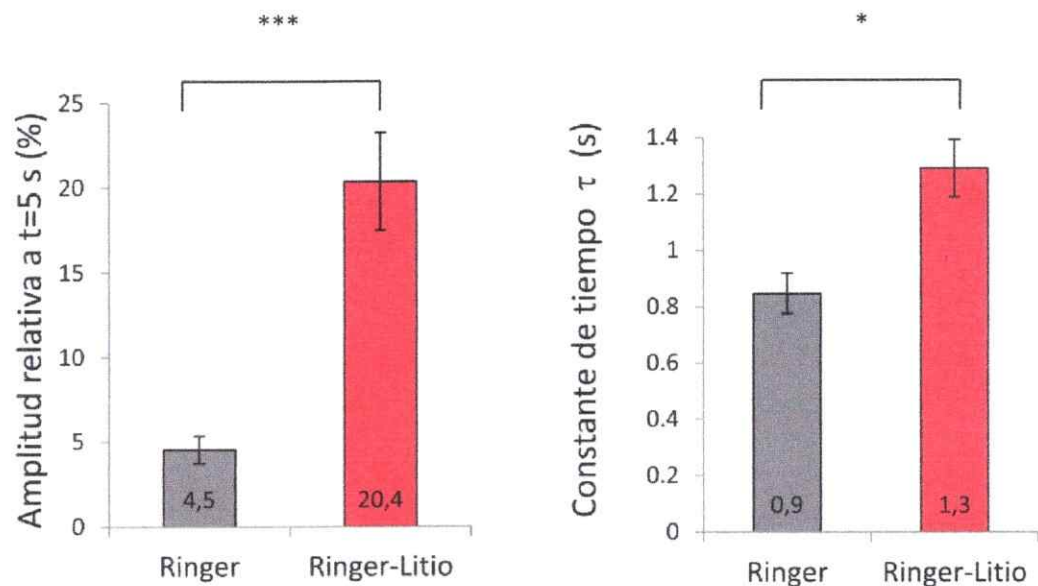


Figura 7. Amplitud relativa de la respuesta a t=5 s y constante de tiempo τ del ajuste a una exponencial simple bajo condiciones control (n=11) y de inhibición de NCX (n=10). N.S., no significancia $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Valores promedios \pm SEM.

Como se mencionó anteriormente, se obtuvieron ajustes significativamente mejores al utilizar un modelo de decaimiento exponencial de dos componentes $[V(t) = V_1 e^{(-t/\tau_1)} + V_2 e^{(-t/\tau_2)} + C]$ tanto para el control como para la condición de inhibición de NCX. Esto sugiere que para esta última condición, existen a lo menos dos mecanismos (iguales o distintos a los obtenidos en condiciones control) que estarían implicados en la relajación de la respuesta. Considerando que los parámetros V_1 y V_2 son un reflejo de cuán representadas están las componentes del ajuste respecto de la amplitud total² ($V_1 + V_2 + C$), sus valores, en conjunto con los valores de τ_1 y τ_2 reflejan el proceso de decaimiento observado en la fase de relajación de la respuesta. En la Figura 8 se muestran los valores promedio de V_1 , V_2 y C en términos porcentuales

² Dado que el ajuste se realizó desde 100 ms luego de que se alcanzara la amplitud máxima (V_{min}), el valor de amplitud total ($V_1 + V_2 + C$) al que se hace referencia, es levemente inferior a V_{min} ; no obstante, para efectos de análisis puede ser considerado como un reflejo confiable de V_{min} .

(respecto de la amplitud total) en un gráfico de columnas apiladas. En la Figura 9 se muestran los cursos temporales de cada componente (τ_1 y τ_2).

Se observa en estas figuras que para la condición control (Ringer), la primera componente presentó una mayor contribución y un menor τ que la segunda componente ($V_1=65,8\%$ y $\tau_1=0,7\pm 0,07$ s vs $V_2=33,7\%$ y $\tau_2=1,9\pm 0,24$ s). Por otra parte, para la condición de inhibición de NCX, si bien se aprecia una mantención de la relación entre las constantes de tiempo observada en el control ($\tau_1<\tau_2$), se observa una disminución en la contribución de la primera componente ($V_1=40,5\%$ y un $V_2=46,8\%$) y un aumento en el valor porcentual de "C", reforzando la idea de que en estas condiciones se produce un retardo en la relajación de la respuesta. La comparación del curso temporal de las componentes entre las dos condiciones estudiadas no arrojó diferencias estadísticamente significativas (Figura 9).

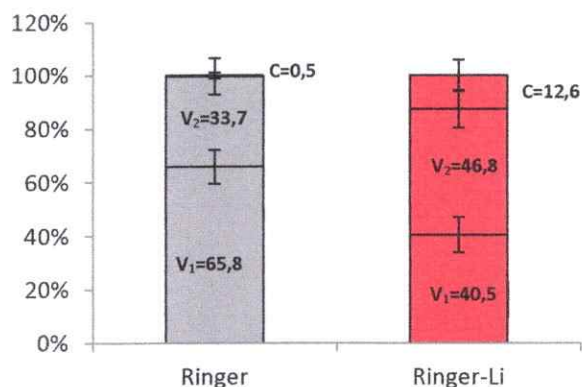


Figura 8. Valores porcentuales de los parámetros V_1 , V_2 y C respecto de la amplitud total bajo condiciones control ($n=11$) y de inhibición de NCX ($n=10$). Valores promedios \pm SEM.

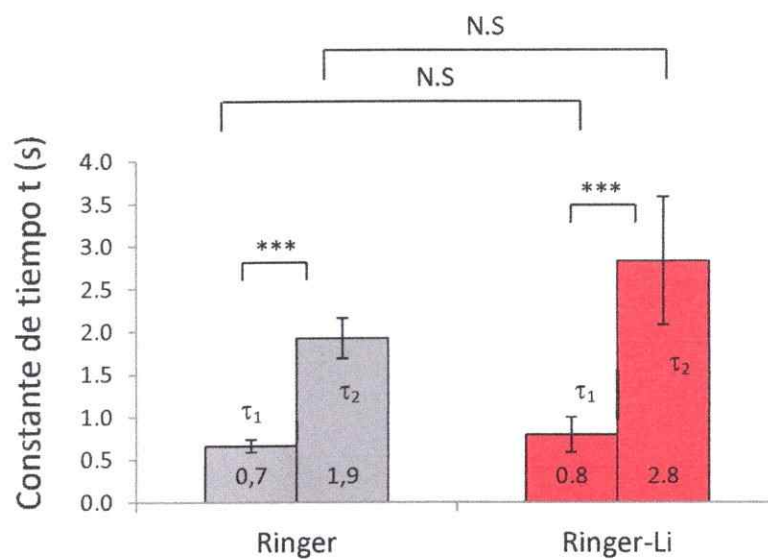


Figura 9. Constantes de tiempo (τ_1 y τ_2) del ajuste a una exponencial doble bajo condiciones control (n=11) y de inhibición de NCX (n=10). N.S., no significancia $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$. Valores promedios \pm SEM.**

VI.3 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTADOR PMCA SOBRE LA CINÉTICA DE RELAJACIÓN DE LA RESPUESTA.

Con el propósito de evaluar la contribución del transportador PMCA en la remoción del Ca^{2+} durante la respuesta, se obtuvieron registros en condiciones de inhibición de esta proteína con el péptido inhibidor selectivo caloxina 1b1 160 μM (n=4) (ver Materiales y métodos), o con solución Ringer pH 9,8 (n=4). En la Figura 10 se muestran los registros promedio normalizados para las condiciones control y de inhibición de PMCA. Si bien a simple vista se observa un retardo en la relajación de la respuesta bajo condiciones de inhibición con Ringer pH 9,8 (trazo café), el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas tanto para la amplitud relativa a $t=5$ s como tampoco para la constante de tiempo τ al comparar entre la condición control y de inhibición de PMCA (ya sea con Ringer pH 9,8 o con caloxina) (Figura 11).

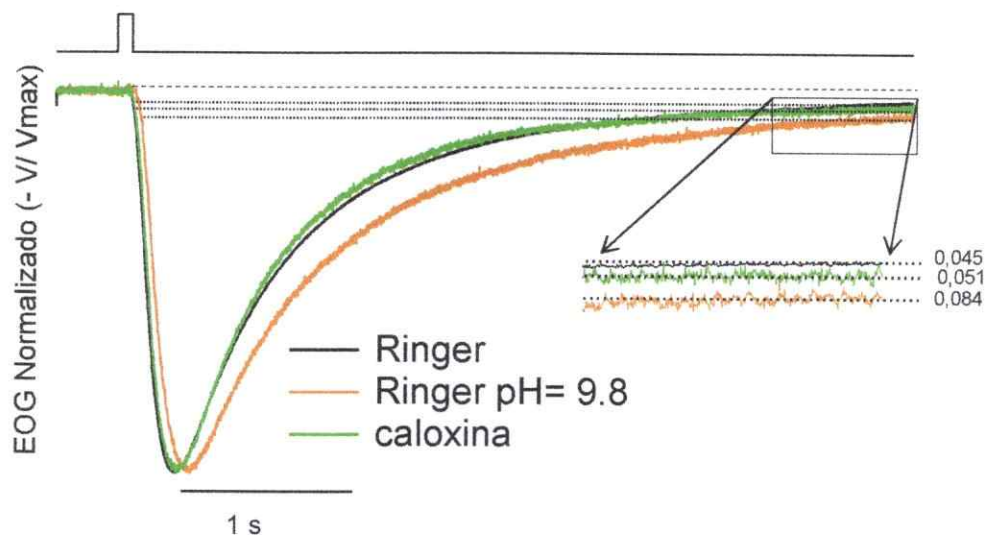


Figura 10. Cinética de relajación de la respuesta para las condiciones control (n=11) y de inhibición del transportador PMCA (n=8). Respuestas promedio normalizadas y superpuestas; condición control (trazo negro); inhibición con caloxina (trazo verde). Inhibición con Ringer básico (trazo café). El trazo horizontal discontinuo superior representa la línea base, y los trazos inferiores indican el valor de amplitud de la respuesta a $t=5$ segundos; que en este caso corresponden al 4,5% (control); 5,1% (caloxina) y 8,4% (pH 9,8) de la amplitud máxima.

La comparación de estos parámetros entre las dos condiciones de inhibición tampoco arrojó diferencias estadísticamente significativas.

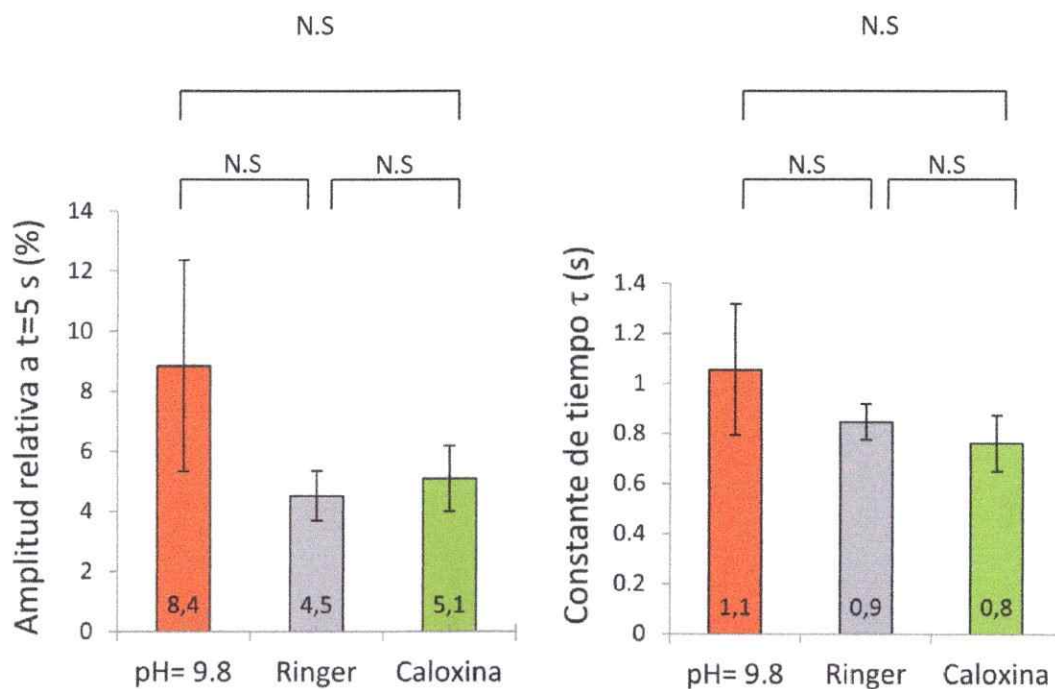


Figura 11. Amplitud relativa de la respuesta a t=5 s y constante de tiempo τ del ajuste a una exponencial simple bajo condiciones control (n=11) y de inhibición de PMCA (n=8). N.S., no significancia $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Valores promedios \pm SEM.

El ajuste exponencial doble a la fase de relajación de la respuesta (que arrojó un mejor ajuste que con una exponencial simple; ver Tabla 1), muestra que bajo condiciones de inhibición selectiva de PMCA con caloxina se obtienen en promedio los mismos cursos temporales de la condición control ($\tau_1=0,7 \pm 0,1$ s y $\tau_2=1,9 \pm 0,7$ s para la inhibición con caloxina versus $\tau_1=0,7 \pm 0,07$ s y $\tau_2=1,9 \pm 0,24$ s para el control; Figura 13), sugiriendo una mantención en la cinética de relajación de la respuesta bajo estas condiciones. No obstante lo anterior, sí es posible observar un cambio en la contribución de cada componente con respecto a la amplitud total, ya que como se

observa en la Figura 12, la segunda componente (al contrario de lo observado bajo inhibición de NCX), disminuye su contribución de, 33,7% (Ringer) a 24,5 % (caloxina).

Bajo condiciones de inhibición por aplicación de Ringer pH 9,8, si bien tampoco se observan diferencias significativas en τ_1 y τ_2 respecto del control, en este caso, y al igual que en condiciones de inhibición de NCX (aunque en un nivel menor), se observa una tendencia a la disminución en la contribución de la primera componente del ajuste, de 65,8% a 55%. Por otra parte, bajo estas condiciones de inhibición de PMCA (ya sea con caloxina o Ringer básico) se observa una tendencia al aumento en el nivel porcentual de "C" (Figura 12), sin embargo, tal como se comprobó para los valores de amplitud relativa (Figura 11), esta tendencia tampoco es estadísticamente significativa.

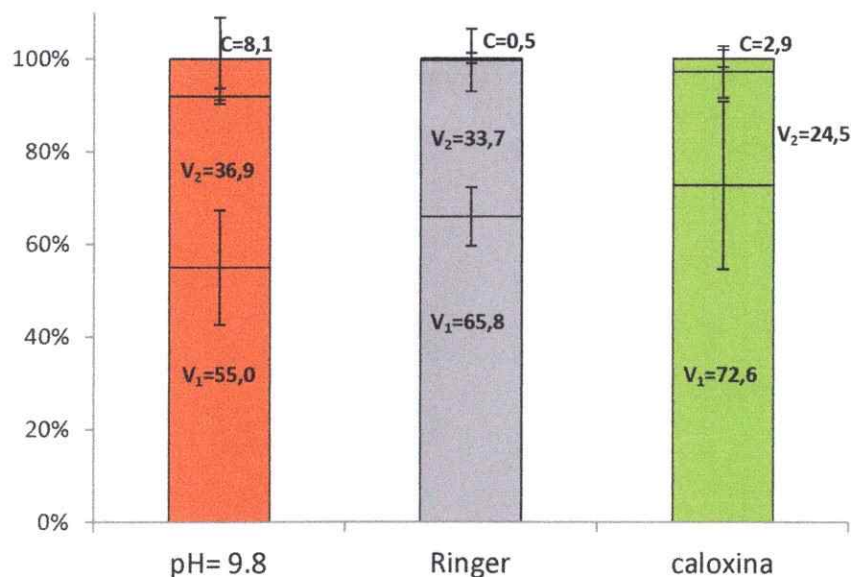


Figura 12. Valores porcentuales de los parámetros V_1 , V_2 y C respecto de la amplitud total bajo condiciones control ($n=11$) y de inhibición de PMCA ($n=8$); [Ringer pH 9,8 ($n=4$) y Ringer + caloxina ($n=4$)].

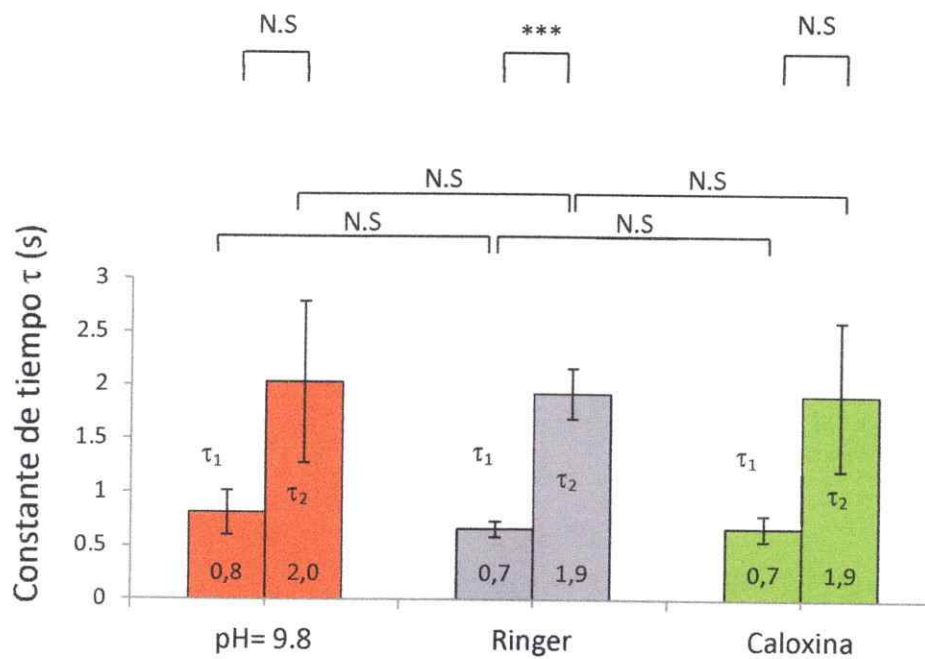


Figura 13. Constantes de tiempo (τ_1 y τ_2) del ajuste a una exponencial doble bajo condiciones control (n=11) y de inhibición de PMCA (n=8); [Ringer pH 9,8 (n=4) y Ringer + caloxina (n=4)]. N.S., no significancia $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$. Valores promedios \pm SEM.**

VI.4 EFECTOS DE LA INHIBICIÓN SIMULTÁNEA DE NCX Y PMCA SOBRE LA CINÉTICA DE RELAJACIÓN DE LA RESPUESTA.

Con el propósito de determinar las características cinéticas de la respuesta bajo condiciones de inhibición simultánea de los transportadores, se llevaron a cabo experimentos en los cuales se aplicó solución Ringer-Li + caloxina (n=2) o Ringer-Li-pH 9,8 (n=7) sobre el epitelio olfatorio. En la Figura 14 se muestran los registros promedio normalizados para estas condiciones. Los resultados de la Figura 15 muestran un aumento significativo en el valor de la amplitud relativa de la respuesta (7,5 a 9 veces el control) y un aumento en el valor promedio de la constante de tiempo τ , de $0,9 \pm 0,1$ s (Ringer) hasta un máximo de $1,8 \pm 0,2$ s (Ringer-Li + caloxina). Por otra parte, se observa que bajo condiciones de doble inhibición con Ringer-Li + caloxina, existen diferencias significativas en el valor de amplitud relativa al comparar con la condición de inhibición individual de NCX con Ringer-Li, sugiriendo un aumento en la importancia relativa de la PMCA bajo estas condiciones.

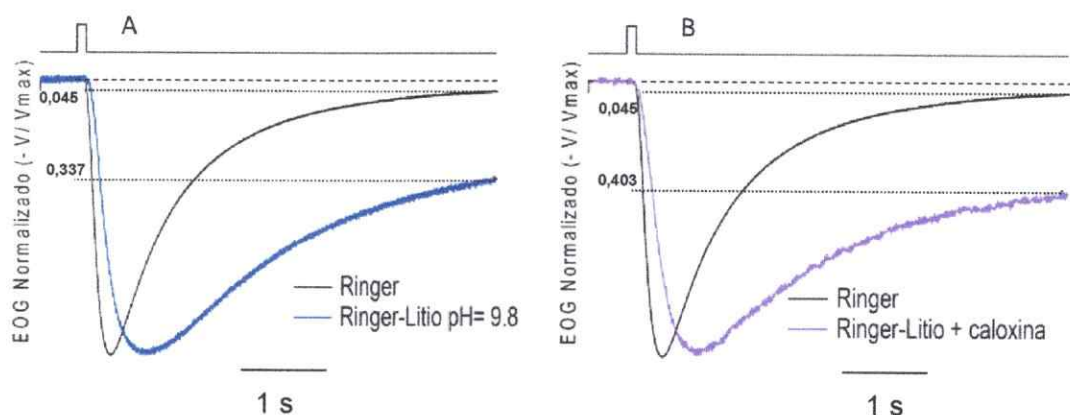


Figura 14. Cinética de relajación de la respuesta para las condiciones control (n=10) y de inhibición simultánea de los transportadores NCX y PMCA(n=9). (A) Comparación de la cinética de la respuesta bajo condiciones control y de inhibición con Ringer-Li pH 9,8. (B) Comparación de la cinética de la respuesta bajo condiciones control y de inhibición con Ringer-Li + caloxina. El trazo horizontal discontinuo superior representa la línea base, y los trazos inferiores indican el valor de amplitud de la respuesta a t=5 segundos; que en este caso corresponden al 4,5% (control); 33,7% (Ringer-Li pH 9,8) y 40,3% (Ringer-Li + caloxina) de la

Se observa en la figura anterior que tanto para la inhibición con Ringer-Li pH 9,8 como para la inhibición con Ringer-Li + caloxina, existe un aumento en el tiempo necesario para alcanzar la amplitud máxima respecto de la situación control ($314 \pm 14,9$ ms para el control; $554,4 \pm 71$ ms para la inhibición con Ringer-Li pH 9,8 y $692,5 \pm 28,5$ para la inhibición con Ringer-Li + caloxina). El análisis estadístico (prueba-T), arrojó diferencias significativas entre estos valores: (un valor- $p= 0.00826$ entre la situación control y la inhibición con Ringer-Li pH 9,8 y un valor- $p= 0.01484$ entre la situación control y de inhibición con Ringer-Li + caloxina). Si se considera que los niveles de Ca^{2+} en el cilio durante la respuesta dependen del balance entre el flujo a través del canal CNG y los mecanismos regulatorios de este catión, es razonable pensar que estas diferencias se deban en parte a posibles alteraciones en este balance. Así, quizás una disminución en la capacidad de remoción de Ca^{2+} como consecuencia de la inhibición de NCX y PMCA, puede también producir un rápido aumento en los niveles intraciliares del complejo Ca^{2+} -calmodulina, y disminuir rápidamente la afinidad de CNG por AMPC. Esto generaría una disminución de la cantidad total de Na^+ y Ca^{2+} que ingresa al cilio por unidad de tiempo, provocando una disminución en la amplitud de la respuesta, y posiblemente un aumento en el tiempo requerido para alcanzarla.

Los resultados de la prueba F, ya sea tanto para la doble inhibición con Ringer-Li pH 9,8 como la para doble inhibición con Ringer-Li + caloxina, no arrojaron diferencias significativas entre los ajustes de la fase de relajación de la respuesta con una exponencial simple y doble (Tabla 1). En la Figura 16 se contrastan los niveles de representación de las componentes del ajuste exponencial doble (V_1 , V_2 y C) de las condiciones control e inhibición de NCX con Ringer-Li, con los niveles de

representación obtenidos del ajuste con una exponencial simple (V y C) para las condiciones de doble inhibición. En la Figura 17 se muestran los valores de las constantes de tiempo de acuerdo al tipo de ajuste realizado. Interesantemente se observa que el τ obtenido del ajuste con una exponencial simple al inhibir selectivamente a PMCA con caloxina (1,8 s) es bastante cercano al valor de τ_2 observado en la condición control (1,9 s).

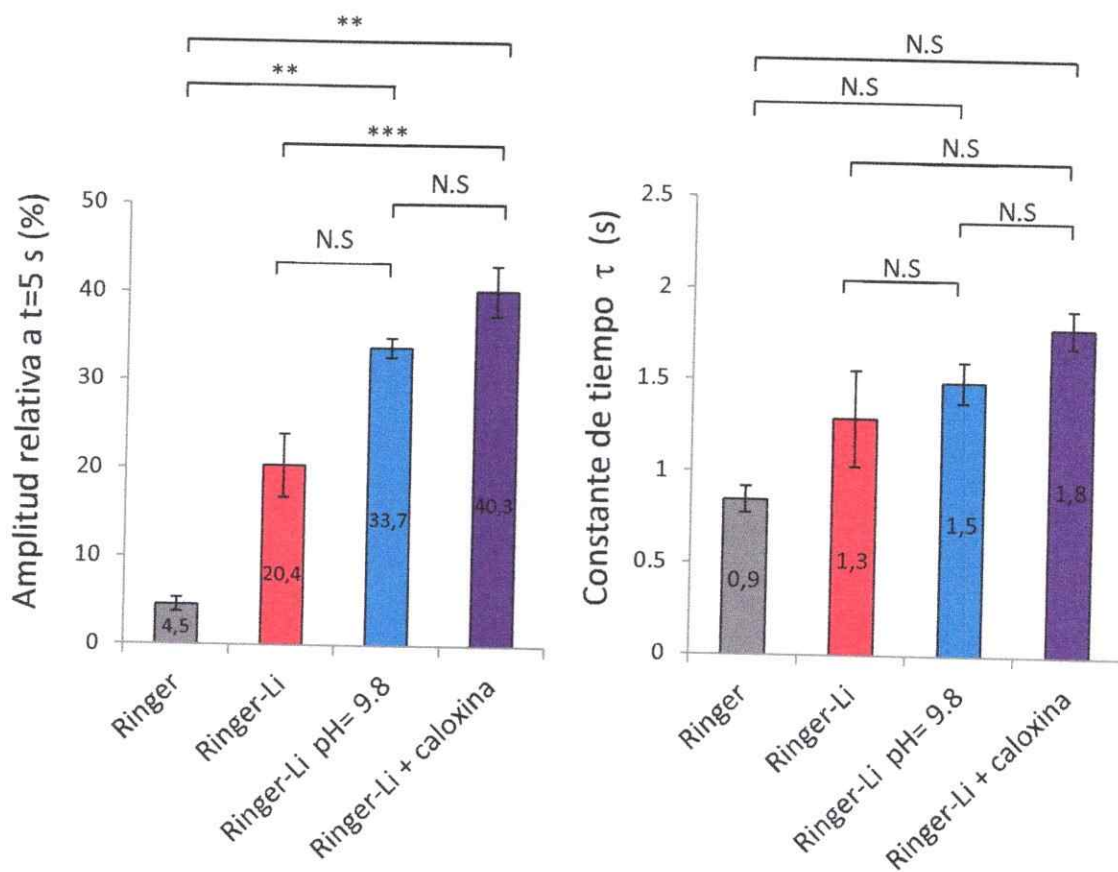


Figura 15. Amplitud relativa de la respuesta a t=5 s y constante de tiempo τ del ajuste a una exponencial simple bajo condiciones control (n=11), de inhibición de NCX (n=10) y de inhibición simultánea de NCX y PMCA (n=9). N.S., no significancia $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Valores promedios \pm SEM.

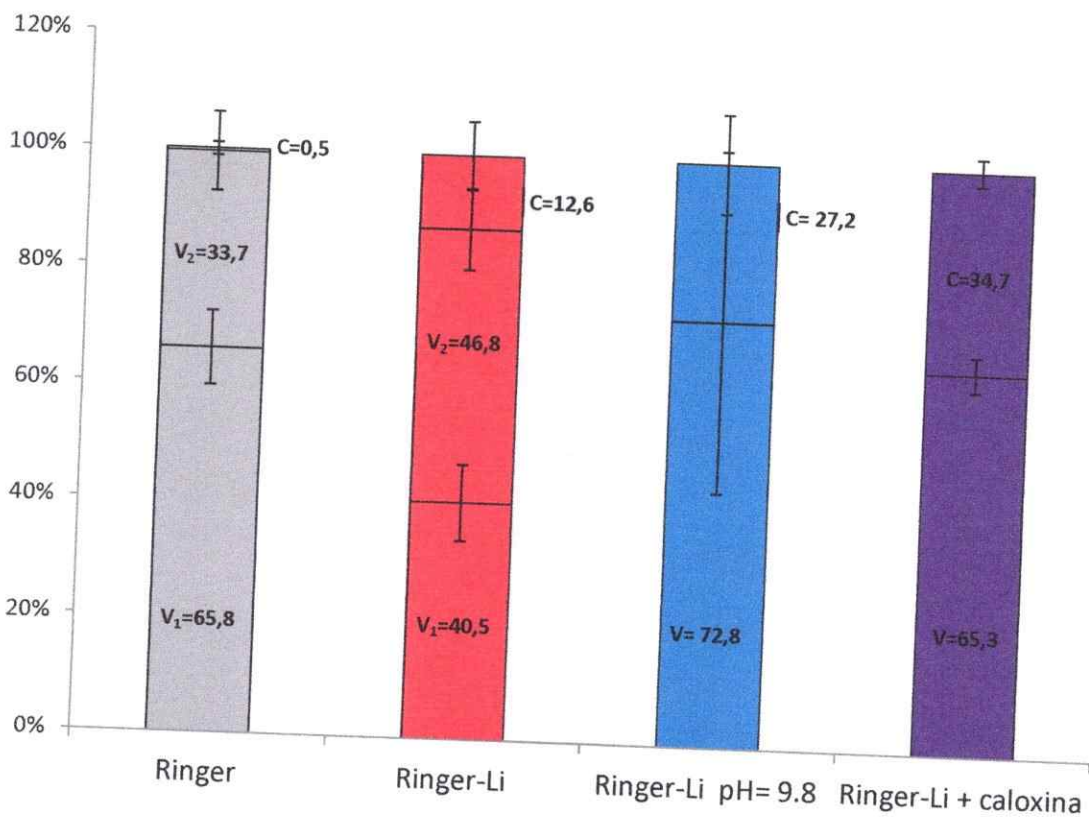


Figura 16. Valores porcentuales de los parámetros V_1 , V_2 y C respecto de la amplitud total del ajuste exponencial doble bajo condiciones control ($n=11$) e inhibición de NCX ($n=10$), y valores de V y C del ajuste exponencial simple bajo condiciones de inhibición simultánea de NCX y PMCA ($n=9$). Dado que en condiciones de doble inhibición, el ajuste con una doble exponencial no arrojó diferencias significativas con el ajuste a una exponencial simple, para esta condición sólo se hace referencia a los valores de "V" correspondientes a $V_{(t=0)}$ y al valor de "C" de la función $V(t) = Ve^{(-t/\tau)} + C$.

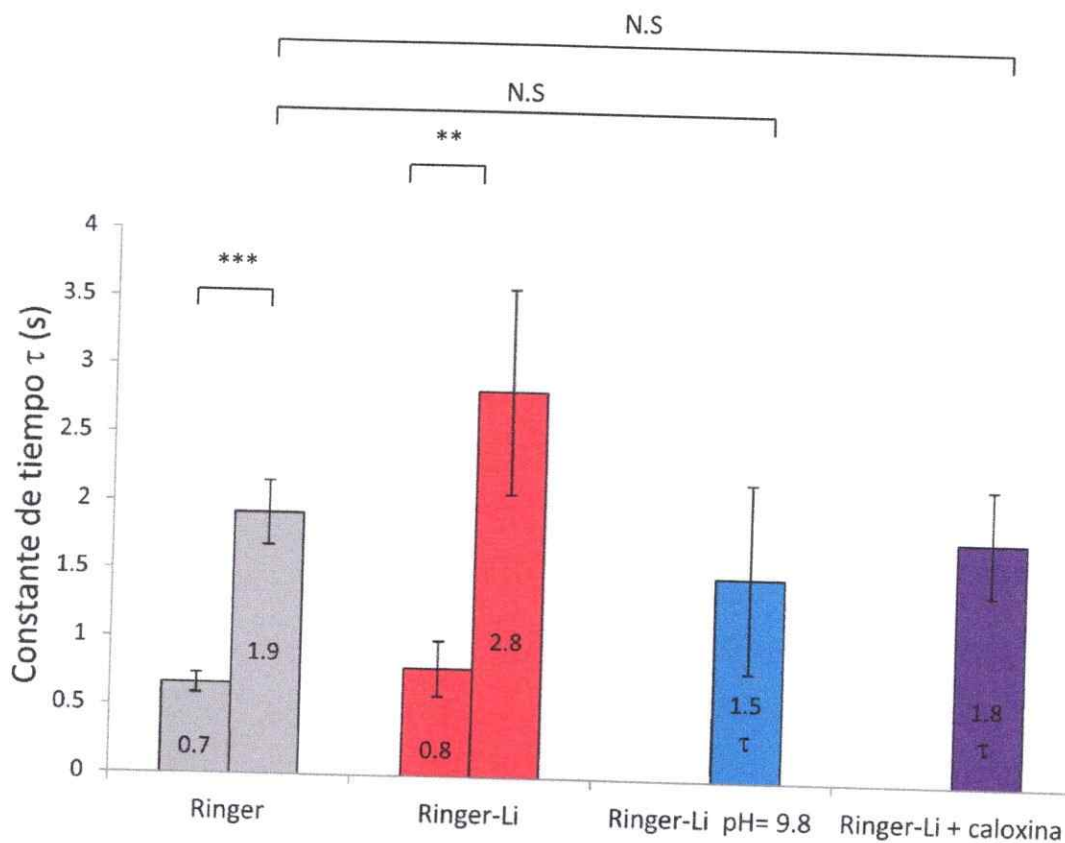


Figura 17. Constantes de tiempo (τ_1 y τ_2) del ajuste a una exponencial doble bajo condiciones control (n=11) e inhibición de NCX (n=10), y constante τ del ajuste exponencial simple bajo condiciones de inhibición simultánea de NCX y PMCA (n=9). Dado que en condiciones de doble inhibición, el ajuste con una doble exponencial no arrojó diferencias significativas con el ajuste a una exponencial simple, para esta condición sólo se hace referencia al valor τ de la función $V(t) = Ve^{(-t/\tau)} + C$. N.S., no significancia $P > 0,07$; * $P < 0,05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Valores promedios \pm SEM

Por otra parte, dado que los registros bajo condiciones de inhibición simultánea en general mostraron bajos valores de amplitud (1,1 mV para la inhibición con Ringer-Li pH 9,8 y 0,4 mV para la inhibición con Ringer-Li + caloxina; Figura 4), se realizó un experimento para confirmar la relativa independencia entre los parámetros de amplitud y constante de tiempo τ , tal como se realizó para la condición control. En la Figura 18-A se muestran dos registros bajo condiciones de inhibición simultánea con Ringer-Li pH 9,8 en donde luego de la obtención de un registro de baja amplitud, se incrementó drásticamente la concentración del odorante isoamil-acetato de 100 μ M a 10 mM para obtener un registro con una amplitud considerablemente mayor (-0,27 mV y -2,41 mV, respectivamente). En la Figura 18-B se muestran estos registros normalizados y superpuestos. Se observa que si bien existe una gran diferencia de amplitud, no hay mayores diferencias en la cinética de relajación de la respuesta (Tabla 3). No obstante, es posible observar una leve disminución en el "tiempo al pico" al estimular con odorante a 10 mM; esto se debe probablemente a que en un estímulo de mayor concentración, el odorante tiene mayor probabilidad de unirse con su receptor, tardando menos en activar el proceso de transducción.

Con la finalidad de mostrar las diferencias y similitudes entre los resultados obtenidos en las distintas condiciones, en las Figuras 19, 20 y 21 se muestra un resumen general de ellos. En la Figura 19 se muestran todos los registros promedio superpuestos, en donde es posible apreciar que el efecto sobre cinética de recuperación de la respuesta para la condición de doble inhibición, es mayor que la suma de los efectos obtenidos bajo inhibición individual de cada transportador (sólo se incluyen los registros en donde se inhibió selectivamente a PMCA con caloxina). En las Figuras 20 y 21 se muestran los resultados del ajuste exponencial simple y doble

(según corresponda) para las distintas condiciones testeadas. En ellas es posible apreciar que en la condición de inhibición simultánea se obtuvieron valores de constantes de tiempo τ muy similares al τ_2 de las condiciones de inhibición individual, y los mayores valores porcentuales de "C".

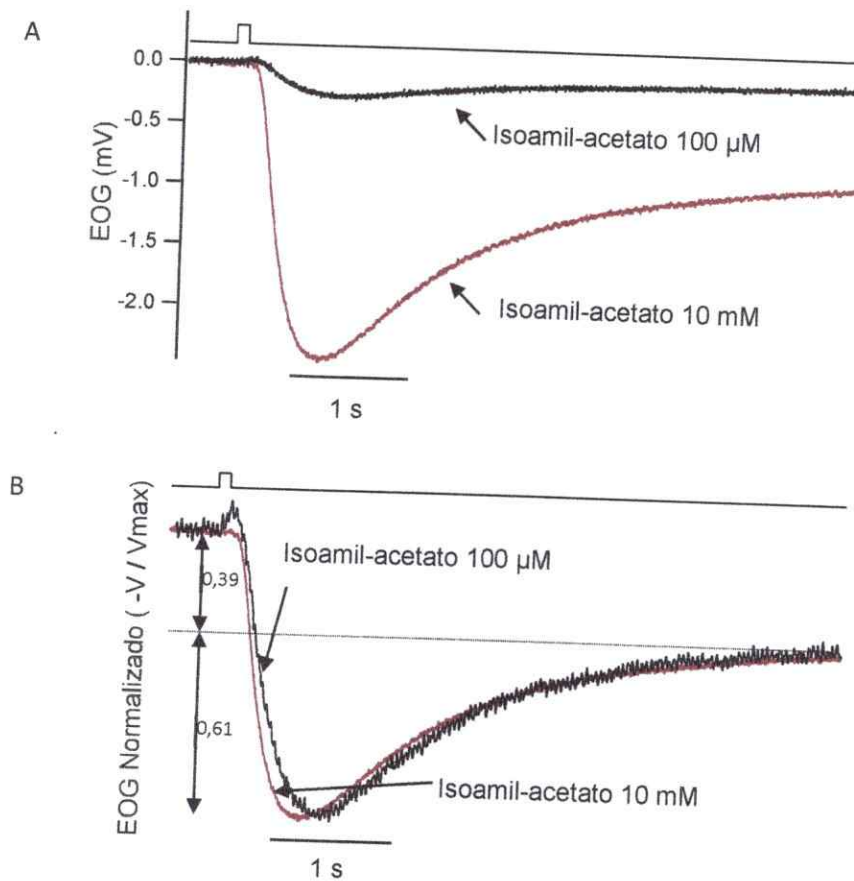


Figura 18. Cambios en la concentración de odorante no afectan la cinética de relajación de la respuesta bajo condiciones de inhibición simultánea de NCX y PMCA. En la misma rata se cambió drásticamente la concentración de odorante, de 100 μM a 10 mM. (A) Superposición de dos registros adquiridos bajo condiciones de inhibición simultánea de los transportadores para las dos concentraciones usadas. (B) Superposición de los registros normalizados bajo las mismas condiciones de inhibición.

Tabla 3. Valores de amplitud y constantes τ y C del ajuste exponencial simple a la fase de relajación de la respuesta a un pulso de odorante de 100 μM y 10 mM bajo condiciones de inhibición simultánea de NCX y PMCA.

[isoamil acetato]	V_{min} (mV)	τ (ms)	Constante C
100 μM	-0,27	1395	-0.087 (32%)
10 mM	-2,41	1371	-0.859 (36%)

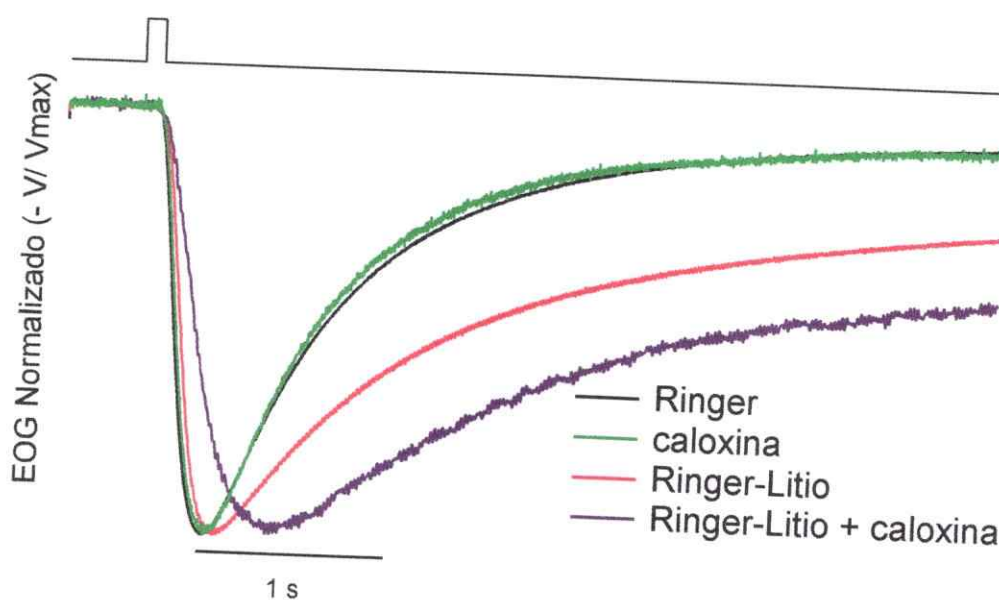


Figura 19. Comparación de la cinética de relajación de la respuesta entre la condición control y las distintas condiciones de inhibición. Control (trazo negro); inhibición de PMCA con caloxina (trazo verde); inhibición de NCX con Ringer-Li (trazo rojo); inhibición simultánea con Ringer-Li + caloxina (trazo púrpura). Se aprecia que en la condición de inhibición simultánea, el efecto sobre la cinética de relajación es mayor que la suma de los efectos bajo condiciones de inhibición individual de los transportadores NCX y PMCA.

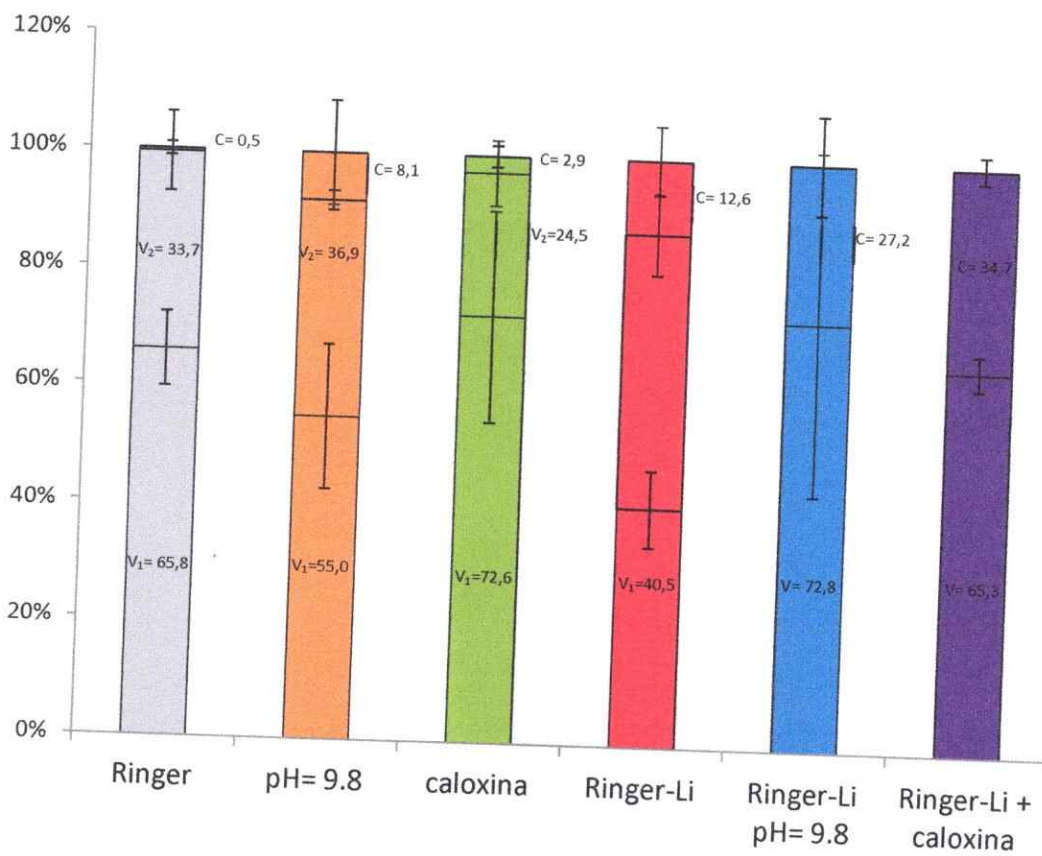


Figura 20. Valores porcentuales de los parámetros V y C del ajuste simple y V_1 , V_2 y C del ajuste doble respecto de la amplitud total, para todas las condiciones.

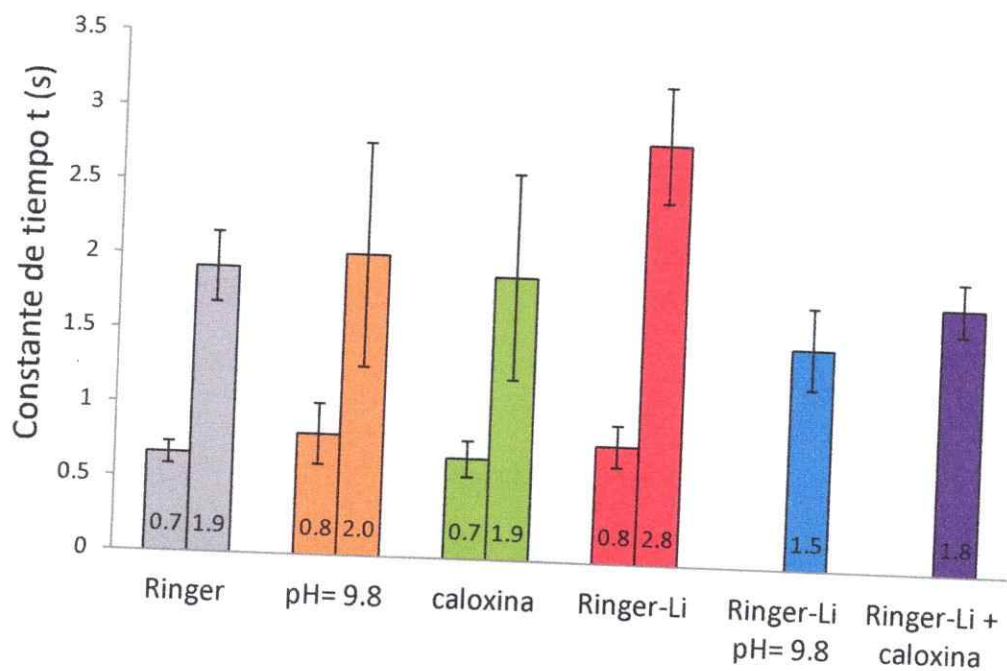


Figura 21. Constantes de tiempo τ del ajuste simple (inhibición simultánea), y τ_1 y τ_2 del ajuste doble para todas las condiciones.

VII. DISCUSIÓN

Existe una aparente variabilidad en la contribución de los transportadores NCX y PMCA en la remoción del Ca^{2+} que ingresa durante la respuesta a odorante entre las distintas especies de vertebrados que se han estudiado (Kleene, 2010). En este estudio abordamos este problema mediante registros de campo en el epitelio olfatorio de rata bajo condiciones de inhibición individual y simultánea de los transportadores.

Un estudio previo en relación al rol de la PMCA en la remoción del Ca^{2+} , demostró que la relajación de la respuesta inducida por IBMX (un inhibidor de la PDE) en ratones *knock-out* para la isoforma 2 de la PMCA, presenta un retardo en la fase de relajación en comparación con ratones silvestres, sugiriendo que la PMCA cumple un rol significativo en la remoción del Ca^{2+} que ingresa durante la respuesta (Saidu y col., 2009). Otros estudios también han reportado un retardo en el tiempo de relajación de la respuesta al exponer NSO de mamíferos y anfibios a carboxieosina (CE), un inhibidor de la PMCA (Castillo y col., 2007; Antolin y col., 2010); no obstante, se ha demostrado que concentraciones de este fármaco tan bajas como 0.1 mM pueden generar un incremento significativo de la corriente a través del canal CNG o afectar inespecíficamente al transportador NCX, lo que en teoría podría dar cuenta de los efectos de enlentecimiento observados en la relajación de la respuesta (Kleene, 2010).

Para inhibir a la PMCA se ha utilizado también el fármaco eosina, un inhibidor de la Ca^{2+} ATPasa relacionado estructuralmente con la carboxieosina, pero que no presenta efectos sobre el transportador NCX hasta concentraciones de 20 mM (Gatto y col., 1995); sin embargo, la eosina es un potente inhibidor de todas las ATPasas, incluyendo la bomba Na^+/K^+ (y es posible que la carboxieosina también lo sea), de

manera que la inhibición de esta bomba podría tener efectos indirectos sobre el transportador NCX como consecuencia de la modificación en la gradiente de Na^+ a través de la membrana. (Kleene, 2010). Esta situación se visualizaría como un retardo en la relajación de la respuesta, y en consecuencia representaría un sesgo al asociarlo con una inhibición específica sobre el transportador PMCA.

El mismo retardo en la fase de relajación de la respuesta ha sido observado al inhibir a PMCA omitiendo el ATP de la solución intracelular en registros de célula completa, o mediante exposición de las NSO a un ambiente alcalino (Castillo y col, 2007). Lo mismo se ha observado al utilizar otro inhibidor de la PMCA llamado vanadato, el cual al igual que eosina, actúa sobre todas las ATP-etasas (Krstic y col., 2009). Por lo tanto, como ninguna de estas aproximaciones está exenta de probables efectos indirectos sobre la bomba Na^+/K^+ (Kleene, 2010), no es posible afirmar sobre la base de éstos que la PMCA participa activamente en la remoción del Ca^{2+} durante la respuesta.

En un estudio reciente en neuronas aisladas de salamandra se registró la respuesta al estimular con IBMX en configuración de pipeta de succión (exponiendo únicamente los cilios) y se aplicó carboxieosina sólo durante la fase de relajación de la respuesta, obteniéndose un retardo significativo de ésta, que no puede asociarse a un efecto indirecto sobre CNG, ya que este canal se cierra rápidamente cuando se estimula con IBMX (Antolin y Matthews, 2007). Además, dada la corta duración en que los cilios fueron expuestos al inhibidor, es poco probable que la gradiente de sodio se vea lo suficientemente modificada como para afectar la actividad de NCX. Interesantemente, este estudio reportó una contribución minoritaria de NCX y mayoritaria de PMCA en la remoción de Ca^{2+} (Antolin y col., 2010). Otro estudio en

Rana temporaria en donde también se estimuló con IBMX, demostró un retardo significativo en la relajación de la respuesta únicamente cuando la concentración de Na^+ en el medio externo fue reducida a un tercio o menos de su valor normal, sugiriendo una dependencia parcial entre la relajación de la respuesta y la gradiente de Na^+ a través de la membrana.

Teniendo estas evidencias en cuenta, parece existir una variabilidad respecto de la importancia relativa de uno u otro transportador entre las distintas especies que se han estudiado. NCX parece ser tener una gran importancia tanto en mamíferos como en anfibios. Sin embargo, dentro de este último grupo de vertebrados existen diferencias entre las distintas especies estudiadas que no permiten generalizar los resultados obtenidos en una especie en particular, al grupo completo de los anfibios, o al subfilo completo de los vertebrados (como se ha hecho hasta el momento).

Respecto de los resultados en las especies de anfibios que se han estudiado, una posible explicación para las diferencias observadas proviene de la consideración del tipo de nicho ecológico que ocupa una determinada especie. El sistema olfatorio de los anfibios sufre cambios substanciales durante la metamorfosis que ocurre como consecuencia del cambio de un hábitat netamente acuático (estado larval) a uno semi-terrestre (estado adulto). En la mayoría de los anfibios la cavidad nasal en estado de adultez está compuesta por dos cámaras, la cavidad nasal principal y la cavidad del órgano vomeronasal (responsable de la transducción de feromonas). No obstante, en *Xenopus laevis*, que ocupa un hábitat acuático en estado de adultez, existe una tercera "cámara media" con NSO provistas con más microvellosidades que cilios y cuya función es la detección de odorantes disueltos en el agua (Hansen y col, 1998). La ausencia de esta tercera cámara en otras especies de anfibios sugiere que la primera

cámara puede presentar un rol dual, tanto en la detección de los odorantes presentes en el agua como en los que se encuentran en el aire (Antolin y col., 2010). De este modo, es posible que los resultados que sugieren un rol minoritario de NCX y prioritario de PMCA, obedezcan a la necesidad de mantener el curso temporal de la relajación de la respuesta dentro de los niveles fisiológicamente óptimos cuando existen condiciones de dilución del moco, y por lo tanto, en condiciones de disminución de la gradiente de Na^+ necesaria para el óptimo funcionamiento de NCX.

Por otra parte, los resultados obtenidos en mamíferos (que asignan un rol minoritario a la PMCA) han sido obtenidos utilizando métodos de inhibición de esta proteína que no permiten asegurar la ausencia de efectos inespecíficos sobre otras proteínas implicadas directa o indirectamente en la transducción. Además, el único estudio en donde se utilizaron ratones *knock-out* para una de las isoformas de la PMCA (Saidu y col., 2009), si bien muestra una contribución significativa de esta proteína mediante experimentos de imágenes de Ca^{2+} en el botón dendrítico, no fue capaz de confirmar dicho hallazgo en los cilios de las neuronas.

Por todo lo anterior, es necesario aproximarse al problema utilizando métodos de inhibición selectiva de los transportadores y definiendo correctamente los reales alcances de los resultados obtenidos en una especie determinada de vertebrado.

En el presente estudio se investigó la contribución de estos transportadores mediante registros de campo en la superficie del epitelio olfatorio de rata (EOG), para lo cual se utilizaron los métodos de inhibición de NCX y PMCA descritos en la literatura, y un nuevo método de inhibición selectiva de PMCA.

Considerando por un lado que este tipo de registros de potencial de campo resulta de la sumatoria de las corrientes individuales de transducción que se generan como consecuencia del estímulo con un odorante, y por otro lado, que la mayoría de la corriente de transducción en estas neuronas depende directamente de los niveles de Ca^{2+} en el cilio, es razonable pensar que la cinética de relajación de la respuesta que se observa en estos registros, refleja (en términos relativos) la dinámica de Ca^{2+} en los cilios durante la respuesta (Stephan y col., 2012).

La inhibición de NCX se realizó sometiendo el epitelio a un ambiente libre de Na^+ a través de la aplicación de Ringer-Li, y la inhibición de PMCA se realizó aplicando solución Ringer pH 9,8 o el péptido inhibidor selectivo caloxina 1b1. De las distintas variantes disponibles comercialmente del inhibidor caloxina (1b1, 2A1 y 3A1) se seleccionó la variante caloxina 1b1, ya que ésta tiene efectos inhibitorios sobre las cuatro isoformas de la PMCA, de las cuales tres (1, 2 y 4) se encuentran en los cilios de las NSO de ratón (Weeraratne y col., 2006) y posiblemente también en NSO de rata (en Material anexo, se muestra el porcentaje de inhibición de las distintas variantes de la caloxina sobre las distintas isoformas de la PMCA en función de la concentración).

Hasta la fecha, todos los estudios que abordan la problemática de la contribución de los transportadores utilizando enfoques electrofisiológicos, se han basado en el análisis de la cinética de relajación de la respuesta para determinar participación de uno u otro transportador a través del análisis de la constante τ derivada del ajuste de la fase de relajación a una exponencial de tipo simple. Sin embargo, éste puede no ser el mejor enfoque si se considera que los transportadores presentan características cinéticas distintas, las que posiblemente pueden ser evidenciadas mediante un tratamiento matemático más adecuado.

De esta manera, y con la intención de visualizar la actividad por separado de NCX y PMCA, en este estudio además de utilizar el criterio de ajuste simple, se realizó un ajuste de la fase de relajación a una exponencial de tipo doble. De este ajuste se determinaron las constantes de tiempo τ_1 y τ_2 y la contribución de cada componente a la amplitud total. Además, con la intención de verificar si este ajuste es mejor que el ajuste a una exponencial simple, se realizó la prueba F para los resultados obtenidos en las distintas condiciones testeadas.

Los resultados del ajuste a una exponencial simple muestran un aumento significativo en la amplitud relativa de la respuesta y un enlentecimiento de la fase de relajación al aplicar Ringer-Li sobre el epitelio (Figura 7), sugiriendo un rol relevante del transportador NCX en la remoción del Ca^{2+} , lo cual se explica por la reducción en la actividad de intercambio de Na^+ por Ca^{2+} (Noe y col., 1997; Stephan y col., 2011).

Por otra parte, si la PMCA participa significativamente en la remoción del Ca^{2+} , entonces bajo condiciones de inhibición selectiva de su actividad debería observarse un retardo significativo en la fase de relajación de la respuesta. Sin embargo, la aplicación de caloxina 1b1 no alteró significativamente la amplitud relativa de la respuesta ni la constante de tiempo τ (Figura 11).

Si bien los resultados de la inhibición con Ringer pH 9,8, no muestran diferencias significativas en la amplitud relativa de la respuesta o la constante τ al comparar con la condición control o de inhibición con c1b1, es posible observar una tendencia al aumento en los valores de estos parámetros que podría asociarse con una disminución de la capacidad de transporte de PMCA como consecuencia de la disminución en la concentración de protones H^+ que esta proteína necesita para

intercambiar por Ca^{2+} (Thomas, 2009). No obstante, considerando los posibles efectos adversos del Ringer pH 9,8 en las neuronas (por cambios en la carga de los aminoácidos o denaturación de las proteínas de membrana por hidrólisis básica), es posible que esta tendencia se deba a efectos inespecíficos sobre la función biológica de las proteínas implicadas en la transducción. Por esta razón, en este estudio se dio preponderancia a los resultados obtenidos bajo condiciones de inhibición de la PMCA con el péptido caloxina, el cual fue diseñado para unirse selectivamente al lado extracelular de la PMCA. En esta condición de inhibición selectiva, los restantes mecanismos de remoción de Ca^{2+} (NCX, difusión y tampones endógenos) están activos y cargan con dicha tarea. Así, dado que no se observan alteraciones en la cinética de relajación, se deduce que la actividad de la PMCA no es requisito para mantener la cinética de relajación de la condición control.

Los resultados de la inhibición simultánea de los transportadores NCX y PMCA (Figura 15) muestran que con Ringer-Li + caloxina se alcanzan los mayores valores de amplitud relativa a $t=5$ s (40,3%) y constante de tiempo τ (1,8 segundos), sugiriendo una fuerte disminución en la capacidad de remoción de Ca^{2+} bajo estas condiciones. Interesantemente, al comparar los resultados de esta inhibición simultánea con los resultados de la inhibición individual de NCX y PMCA, se observa que el valor de amplitud relativa en la doble inhibición es mayor que la suma de los valores obtenidos para las inhibiciones individuales (40,3% para la doble inhibición, que es mayor a la suma de 5,1% para la inhibición de PMCA con caloxina y 20,4% para la inhibición de NCX con Ringer-Li). Dado que la única diferencia experimental entre la condición de doble inhibición (Ringer-Li + caloxina) y la inhibición del NCX (Ringer-Li) es la

presencia del péptido c1b1, las diferencias en los resultados de amplitud relativa y constante τ , sólo pueden asociarse con la actividad de la PMCA.

Si se considera que la PMCA presenta una tasa de transferencia de 10 a 50 veces menor que la de NCX (Blaustein y Lederer, 1999), es posible que en condiciones pseudofisiológicas (como la condición control), la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa sea enmascarada por la gran capacidad de intercambio de NCX, de manera que la actividad de la primera sólo sea visible bajo condiciones de inhibición de NCX, en donde posiblemente se produce una potenciación en la actividad de PMCA por el aumento de Ca^{2+} , situación que ya ha sido descrita anteriormente en vesículas enriquecidas en membrana ciliar de rata (Castillo y col, 2007).

Los resultados del análisis de bondad de ajuste al utilizar los dos criterios mencionados anteriormente, señalan que el ajuste con una doble exponencial (con la excepción de los registros bajo doble inhibición) da cuenta de mejor manera de la cinética de relajación de la respuesta (Tabla 1). Esto evidencia la actividad simultánea de al menos dos procesos con características cinéticas diferenciables que estarían implicados en la relajación de la respuesta. Interesantemente, estos procesos cinéticos distintos se mantienen bajo condiciones de inhibición individual de los transportadores, sugiriendo la posibilidad de una inhibición parcial de éstos.

Considerando las diferencias en la cinética de los transportadores, es posible que las constantes de tiempo y amplitudes derivadas del ajuste con una exponencial doble, puedan reflejar en parte, la actividad de los transportadores NCX y PMCA, siendo la componente más rápida y de mayor amplitud un reflejo indirecto de la actividad del transportador NCX, mientras que la más lenta y de menor amplitud, de la actividad de la PMCA.

Para la condición control se observan dos componentes claramente diferenciables en términos de contribución y curso temporal, las cuales podrían estar reflejando la actividad de NCX y PMCA. Además, bajo condiciones de inhibición individual de uno u otro transportador, no se pierde el carácter bifásico de la relajación (apoyando la idea de una inhibición parcial), sino que más bien se producen cambios en la contribución a la amplitud total de cada componente que van en sentidos contrarios al inhibir NCX o PMCA respectivamente (Figura 20). De acuerdo a esto, la primera componente del ajuste podría estar reflejando la actividad de NCX y la segunda componente la actividad de PMCA.

Respecto de las constantes τ_1 y τ_2 , en la Figura 21 es posible apreciar que, con excepción de la doble inhibición, en promedio tienden a mantenerse los cursos temporales observados en la condición control, lo cual concuerda con la noción de que la inhibición parcial de alguno de los transportadores no modifica sus características cinéticas.

Por otra parte, dado el valor de τ bajo inhibición simultánea de los transportadores es muy cercano al τ_2 de la condición control, es posible que en esta condición de doble inhibición, la actividad de la PMCA (asociada posiblemente a la segunda componente) sea preponderante por sobre la actividad de NCX.

Finalmente, dado que la técnica de EOG no permite tener un control fino de ciertas variables importantes que podrían influir en la relajación de la respuesta, como el potencial de membrana, contribución de los potenciales de acción a la forma de la curva, o contribución de otros mecanismos de remoción de Ca^{2+} (como difusión hacia la dendrita), es necesario realizar experimentos más precisos, como registros en célula

completa (*whole-cell*) o registros en cilios aislados que permitan controlar las variables mencionadas y así medir certeramente la actividad de los transportadores NCX y PMCA.

VIII. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren una contribución importante del transportador NCX en la remoción del Ca^{2+} durante la respuesta a odorante en NSO de rata, mientras que asignan a la PMCA una contribución lo suficientemente baja como para no ser detectada en registros de EOG a menos que se inhiba a NCX.

Memoria Financiada por el Proyecto Fondecyt 1100862.

IX. REFERENCIAS

1. Antolin S. y H.R. Matthews. (2007) The effect of external sodium concentration on sodium-calcium exchange in frog olfactory receptor cells. *J. Physiol.* 581:495–503.
2. Antolin S., Reisert J. y Matthews HR. (2010) Olfactory response termination involves Ca^{2+} -ATPase in vertebrate olfactory receptor neuron cilia. *J. Gen Physiol.* 135: 367–378.
3. Benham C. D., Evans M.L. y McBain C. J. (1992) Ca^{2+} efflux mechanisms following depolarisation-evoked calcium transients in cultured rat sensory neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 1992;455:567–583. peer-00706312, version 1 - 10 Jun 201214
4. Blaustein M.P. y Lederer W.J. (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79, 763–854.
5. Borisy F.F., Ronnett G.V, Cunningham A.M., Juilfs D., Beavo J. y Snyder S.H. (1992) Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons. *J. Neurosci.* 12:915–923.
6. Carafoli E. y Brini M. (2000) Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4, 152–161.
7. Castillo K, Delgado R. y Bacigalupo J. (2007) Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in the cilia of olfactory receptor neurons: possible role in Ca^{2+} clearance. *Eur J Neurosci.* 16:2524–2531.
8. Chen T.Y. y Yau K.W. (1994) Direct modulation by Ca^{2+} -calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons. *Nature*, 368, 545–548.
9. Cygnar K.D. y Zhao H. (2009) Phosphodiesterase 1C is dispensable for rapid response termination of olfactory sensory neurons. *Nat. Neurosci.* 12, 454–462
10. Cygnar K.D., Stephan AB. y Zhao H. (2010) Analyzing Responses of Mouse Olfactory Sensory Neurons Using the Air-phase Electroolfactogram Recording. *J. Vis. Exp.* (37), e1850.
11. 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.*, 430, 135–158
12. Firestein S. y Zufall F. (1994) The cyclic nucleotide gated channel of olfactory receptor neurons. *Semin. Cell. Biol.*, 5, 39–46.
13. Gatto C., Hale C.C., Xu W. y Milanick M.A. (1995) Eosin, a potent inhibitor of the plasma membrane Ca pump, does not inhibit the cardiac Na-Ca exchanger. *Biochemistry.* 34:965–972.

14. Hansen A., Reiss J.O., Gentry C.L. y Burd G.D. (1998) Ultrastructure of the olfactory organ in the clawed frog, *Xenopus laevis*, during larval development and metamorphosis. *J. Comp. Neurol.* 1998;398:273–288.
15. Jung A., Lischka F.W., Engel J. y Schild D. (1994) Sodium/calcium exchanger in olfactory receptor neurones of *Xenopus laevis*. *NeuroReport.* 1994;5:1741–1744..
16. Kleene S.J. (1993) Origin of the chloride current in olfactory transduction. *Neuron.* 1993;11:123–132.
17. Kleene S.J. (2010) Limits of calcium clearance by plasma membrane calcium ATPase in olfactory cilia. *PLoS One* 5: e15676.
18. Krstić D., Colović M., Bosnjaković-Pavlović N., Spasojević-De Bire A. y Vasić V. (2009) Influence of Decavanadate on Rat Synaptic Plasma Membrane ATPases Activity. *Gen.PhysiolBiophys.* 28, no. 3: 302-308.
19. Griff E.R., Kleene N.K. y Kleene S.J. (2012) A Selective PMCA inhibitor does not prolong the Electroolfactogram in Mouse. *Plos One* 7(5): e37148.
20. Kurahashi T. y Menini A. (1997) Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell. *Nature* 385, 725–729.
21. Kurahashi T. y Yau K.W. (1993) Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature* 363, 71–74.
22. Kwon H.J., Koo J.H., Zufall F., Leinders-Zufall T. y Margolis F.L. (2009) Ca²⁺ Extrusion by NCX Is Compromised in Olfactory Sensory Neurons of OMP^{-/-} Mice. *PLoS ONE* 4(1): e4260.
23. Leinders-Zufall T., Greer C.A., Shepherd G.M. y Zufall F. (1998) Imaging odor- induced calcium transients in single olfactory cilia: Specificity of activation and role in transduction. *J. Neurosci.* 18: 5630–5639.
24. Liu M., Chen T.Y., Ahamed B., Li J. y Yau K.W. (1994) Calcium-calmodulin modulation of the olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Science.* 266:1348–1354.
25. Lowe G. y Gold G.H. (1993b) Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature*, 366, 283–286.
26. Madrid R., Delgado R. y Bacigalupo J (2005) Cyclic AMP cascade mediates the inhibitory odor response of isolated toad olfactory receptor neurons. *J. Neurophysiol.*, 94, 1781–1788.
27. Menco B.P. (1997) Ultrastructural aspects of olfactory signaling. *Chem Senses* 22: 295–311.

28. Morales B., Ugarte G., Labarca P. y Bacigalupo J. (1994) Inhibitory K^+ current activated by odorants in toad olfactory neurons. *Proc. Biol. Sci.*, 257, 235–242.
29. Noé J., Tareilus E., Boekhoff I. y Breer H. (1997) Sodium/calcium exchanger in rat olfactory receptor neurons. *Neurochem.Int.* 30: 523–531.
30. Pande J., Szewczyk M.M. y Grover A.K. (2011) Allosteric inhibitors of plasma membrane Ca^{2+} pumps: Invention and applications of caloxins. *World J. BiolChem* 26: 39–47.
31. Reese T.S. (1965) Olfactory cilia in the frog. *J. Cell Biol* 25: 209–230.
32. Reisert J. y Matthews H.R. (1998) Na^+ -dependent Ca^{2+} extrusion governs response recovery in frog olfactory receptor cells. *J. Gen Physiol* 112, 529–535.
33. Reisert J. y Matthews H.R. (2001a) Response properties of isolated mouse olfactory receptor cells. *J. Physiol* 530, 113–122.
34. Reisert J., Bauer P.J., Yau K.W. y Frings S. (2003) The Ca-activated Cl channel and its control in rat olfactory receptor neurons. *J. Gen Physiol* 122: 349–363.
35. Saidu S.P., Weeraratne S.D., Valentine M., Delay R. y Van Houten J.L. (2009) Role of plasma membrane calcium ATPases in calcium clearance from olfactory sensory neurons. *Chem. Senses* 34: 349–358.
36. Schwiening C.J., Kennedy H.J. y Thomas R.C. (1993) Calcium-hydrogen exchange by plasma-membrane Ca-ATPase of voltage-clamped snail neurons. *Proc Biol Sci.* 1993;253:285–289.
37. Stephan A.B., Shum E.Y., Hirsh S., Cygnar K.D., Reisert J. y Zhao H. (2009) ANO2 is the ciliary calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 11776–11781.
38. Stephan A.B., Tobochnik S., Dibattista M., Wall C.M., Reisert J. y Zhao H. (2012) The $Na(+)/Ca(2+)$ exchanger NCKX4 governs termination and adaptation of the mammalian olfactory response. *Nat Neurosci.* 2012;15:131–137.
39. Szewczyk M.M., Pande J. y Grover A.K. (2007) Caloxins: a novel class of selective plasma membrane Ca^{2+} pump inhibitors obtained using biotechnology. *PflugersArch* 456: 255–266.
40. Thomas R.C. (2009) The plasma membrane calcium ATPase (PMCA) of neurons is electroneutral and exchanges 2 H^+ for each Ca^{2+} or Ba^{2+} ion extruded. *J Physiol* 587, no. Pt 2: 315–327.

41. Vogler C. y Schild D. (1999) Inhibitory and excitatory responses of olfactory receptor neurons of xenopus laevis tadpoles to stimulation with amino acids. *J. Exp. Biol.*, 202, 997–1003.
42. Wayman G.A., Impey S. y Storm D.R. (1995) Ca²⁺ inhibition of type III adenylyl cyclase in vivo. *J. Biol. Chem.*, 270, 21480–21486.
43. Weeraratne S.D., Valentine M., Cusick M., Delay R. y Van Houten J.L. (2006) Plasma membrane calcium pumps in mouse olfactory sensory neurons. *Chem. Senses*, 31, 725–730.
44. Yan C., Zhao A.Z., Bentley J.K., Loughney K., Ferguson K. y Beavo J.A. (1995) Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. *Proc. NatlAcad. Sci. USA*, 92, 9677–9681.

X. MATERIAL ANEXO.

Características inhibitorias de las distintas variantes del péptido caloxina sobre las isoformas de la PMCA.

