



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL BULBO
OLFATORIO MEDIADA POR LA MICROGLÍA**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

KEILA DARA ROJAS GARCÍA

TUTOR DE TESIS:

DR JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:

DRA. ANAID ANTARAMIAN SALAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

JURIQUILLA, QRO., SEPTIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



A mis padres y hermanos. En memoria del año يأنصف

“La vida no se apoderó de la Tierra mediante el combate, sino por la composición de las redes.”

_Lynn Margulis

“El mayor desafío de los neurocientíficos será la necesidad de controlar un tipo de celular cerebral sin alterar la actividad del resto. Es concebible el diseño de un tipo de célula que sea sensible a la luz.”

_Francis Crick

“Hay preguntas profundas sobre el cerebro que quizás nunca se respondan, sin embargo la optogenética nos confiere un progreso.”

_Karl Deisseroth

“Sólo podemos ver un poco del futuro, pero lo suficiente como para darnos cuenta de que hay mucho que hacer.”

_Alan Turing

AGRADECIMIENTOS

Titular del Laboratorio y Tutor de Tesis:

Dr. José Fernando Peña Ortega

Comité Tutorial:

Dra. Anaid Antaramian Salas

Dr. José Jesús García Colunga

Técnico Académico del Laboratorio C-01:

Dr. Benito Ordaz Sánchez

Unidad de Proteogenómica

Dra. Anaid Antaramian Salas

M. en C. Adriana González-Gallardo

Bioterio

MVZ. José Martín García Servín

Dra. Alejandra Castilla León

MVZ. Fernando López Barrera

Unidad de Análisis Conductual

Dra. Deisy Gasca Martínez

Unidad de Microscopia

Elsa Nydia Hernández Ríos

Apoyo técnico

Dr. Siddhartha Mondragón Rodríguez, Lab C-01

M. en C.F. Azucena Aguilar Vázquez, Lab C-02

Integrantes del Laboratorio C-01:

M. en C. Rebeca Hernández Soto

M. en C. Jonathan J. I. Lorea Hernández

Dra. Karla Salgado Pulga

M. en C. Perla González Pereyra

M en C. Anahí Salas Gallardo

M en C. Neira Polet Camacho Hernández

Q.F.B. Carlos Enrique Montalvo Blanco

M. en C. Benjamín Villasana Salazar

M en I Josué de Jesús Juárez Vidales

Dr. Arturo González Isla

M en C. José María Cornejo Montes de Oca

Lic. Lorena Xolalpa Cueva

Ing. María Estefanía Guerrero Gómez

Personales

Gilberto Rojas Vite

Rebeca Hernández Soto

Germán García Moreno

Hugo Saavedra Bonilla

نصف و همزة

Jaime Daniel Cadena Valencia

Marc Emil Jean Bonnel



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de “Circuitos Neuronales” (C-01), en el Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión del Dr. José Fernando Peña Ortega.

En el curso de la elaboración de esta tesis se contó con el apoyo de los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 235789 y 117) y de la Dirección General de Estudios de Posgrados de la UNAM (DGAPA-UNAM, IN202018-2). Asimismo, la beca para el desarrollo de este trabajo fue otorgada por el CONACyT (becario: 612138).

1. Introducción	9
1.1 El sistema olfatorio.....	9
1.1.1 Organización Morfo-funcional del Sistema Olfatorio Principal	9
1.1.2 El bulbo olfatorio (BO).....	12
1.1.3 Actividad eléctrica del bulbo olfatorio	15
1.2 La Microglía	19
1.2.1 La influencia de la microglía en la función de los circuitos neuronales	23
1.2.1.1 La influencia de la microglía en la configuración de los circuitos neuronales del BO	25
1.2.1.2 La influencia de la microglía en la fisiología del BO y patologías asociadas a la inflamación	27
1.3 La Optogenética	29
1.3.2 Opsinas Microbianas y su uso en la optogenética.....	31
1.3.2.1 La Channelrhodopsina 2 (ChR-2).....	33
1.3.3 Modulación optogenética de los circuitos neuronales	34
1.3.4 Control optogenético de las células gliales.....	37
1.4 Activación microglial farmacológica	39
2. Justificación	41
3. Hipótesis	41
4. Objetivo General	41
4.1. Objetivos Particulares	41
5. Sujetos, Materiales y Métodos	42
5.1 Animales.....	42
5.2 Microinyección de los vectores adenovirales	43
5.3 Verificación de la expresión de la ChR2 y la GFP mediante imágenes de fluorescencia	44
5.4 Protocolo de inmunohistoquímica para la verificación de la expresión de la ChR2 de manera específica en la microglía	45
5.5 Protocolos de Genotipificación de los animales transgénicos	47
5.5.1 CX3CR1-Cre.....	47
5.5.1.1 Extracción de ADN.....	47
5.5.1.2 Reacción de PCR	47

5.5.1.3 Gel de agarosa al 1.6 %.....	48
5.5.2 CX3CR1-Cre/Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE.....	48
5.5.2.1 Reacción de PCR	49
5.6 Experimentos In Vivo	50
5.6.1 Craneotomía, Protocolo de Registro Electrofisiológico de Campo y estimulación fótica.....	50
5.6.1.1 Grupo experimental-activación microglial mediante la activación de la ChR2	50
5.6.1.2 Grupos control: GFP y ChR2 (-).....	51
5.6.1.3 Grupo experimental-activación microglial mediante la estimulación del compuesto fotosensible PAM-FAM	52
5.6.1.4 Grupo Control: PAM-FAM (-) y luz ultravioleta	53
5.6.2 Grupo Experimental-activación optogenética de la microglía y su efecto en la detección olfatoria.....	54
6. Análisis de los datos	55
6.1 Análisis Estadístico	56
7. Resultados	57
7.1 Estandarización de las coordenadas de microinyección	57
7.2 Verificación de la expresión de la ChR2 en la microglía del BO mediante imágenes de fluorescencia y estandarización del protocolo de fotoestimulación.....	58
7.3 Verificación de la expresión de la GFP en el BO mediante imágenes de fluorescencia	60
7.4 Verificación de la difusión del lipopéptido PAM-FAM mediante imágenes de fluorescencia	61
7.5 Verificación de la expresión de la ChR2 de manera específica en la microglía mediante inmunohistoquímica	62
7.6 Genotipificación de los ratones transgénicos	64
7.7 La activación optogenética de la microglía disminuye la actividad espontánea de la capa granular del BO in vivo	66
7.8 La activación optogenética de la microglía disminuye el incremento en la potencia de la actividad inducida en la capa granular del BO por exposición al acetato de amilo	69
7.9 La activación optogenética de la microglía disminuye el incremento en la potencia de la actividad inducida en la capa granular del BO por exposición a esencia de limón	73
7.10 La modulación microglial mediante la activación del lipopéptido PAM-FAM disminuye el incremento en la potencia de la actividad inducida en la capa granular del BO por	

exposición al acetato de amilo	77
7.11 La modulación microglial mediante la activación del lipopéptido PAM-FAM disminuye el incremento en la potencia de la actividad inducida en la capa granular del BO por exposición a esencia de limón	81
7.12 Los efectos de la activación microglial mediante la activación optogenética son similares a los efectos de la activación inducida por el lipopéptido PAM-FAM en la potencia de la actividad inducida en la capa granular del BO	84
7.13 La activación optogenética de la microglía disminuye la detección olfatoria.....	85
86	
8. Discusión	86
8.1 Posibles mecanismos involucrados en la activación optogenética de la microglia	87
8.2 La estimulación óptica de la ChR2 en la microglía induce la alteración de la actividad espontánea e inducida por aromas en el BO, así como una disminución en la capacidad olfatoria.....	95
8.3 Efecto de la estimulación optogenética en comparación con la estimulación farmacológica mediante la activación del PAM-FAM en la microglía del BO.....	97
9. Conclusión	99
10. Bibliografía	100
11. Lista de Abreviaturas	125
12. Anexos	127
13. Lista de Tablas y Figuras	128

RESUMEN

La microglía, es un tipo celular glial cuyo estudio se ha enfocado en las funciones que ejerce dentro del sistema nervioso central mediante la respuesta inmune innata. Sin embargo, en los últimos años, se ha estudiado el rol que la microglía tiene en el funcionamiento normal de los circuitos neuronales. En este proyecto, nos propusimos utilizar la estimulación de la microglía para entender la influencia de este tipo celular en la fisiología y configuración de la red neuronal del bulbo olfatorio así como en la capacidad olfatoria. Este objetivo fue abordado mediante el uso de la optogenética, una técnica que fue desarrollada en las neurociencias con el fin de realizar el control remoto específico de diversos tipos celulares como las neuronas y las células gliales. Estas últimas, se han convertido en un blanco reciente para esta técnica. Por tanto, se realizó la caracterización de los efectos de la estimulación optogenética en la actividad inducida por olores, en microglía que expresa channelrodopsina-2 (ChR2). Los resultados muestran que la estimulación fótica de la microglía provoca una disminución en la potencia de la actividad inducida por aromas en la capa granular del bulbo olfatorio, posiblemente por la activación de la microglía. Asimismo, para evaluar el efecto de la activación de la microglía de una manera alternativa, se realizó la activación fótica mediante luz UV de un compuesto agonista de los receptores tipo TLR2 presentes en este tipo celular. Los resultados mostraron un efecto similar al encontrado mediante la activación optogenética. Finalmente, para evaluar el efecto de la activación optogenética de la microglía con la capacidad olfatoria de los ratones, se realizó la estimulación fótica en ratones que expresaban ChR2 de manera endógena mientras se llevaba a cabo la prueba conductual del alimento enterrado. Nuestros resultados mostraron que la activación fótica induce una alteración olfatoria que se expresa en un mayor tiempo para encontrar el alimento enterrado, lo que nos permite sugerir que la activación de la microglía tiene una influencia en la configuración de los circuitos del bulbo olfatorio y su fisiología.

SUMMARY

Microglia is a glial cell whose study has focused on the functions they perform within the central nervous system during the innate immune response. However, in recent years, the role of microglia in the normal neural circuits function has started to be studied. In this project, we used optogenetics to stimulate microglia to understand the role of this cell type on the physiology and configuration of the olfactory bulb neural network as well as on the olfactory capacity. This objective was addressed through the use of optogenetics, a technique that was developed in neuroscience to specifically control several cell types, such as neurons. Recently, glial cells have become a potential target for this type of manipulation. First, we characterized the effects of optogenetic stimulation in the OB activity induced by odors. The results showed that light stimulation of microglia expressing channelrhodopsin-2 causes a decrease in the power of odor-induced-activity in the granular layer of the OB. This was possible due to microglial activation. Secondly, we also evaluated the effect of microglial activation through the activation of a TLR2 in microglia receptor with a UV-sensitive agonist. The results showed a similar effect compared to optogenetic activation. Finally, we evaluated the effects of microglial activation through optogenetics in the olfactory function. For this purpose, we stimulated mouse while they performed the buried food test. We found that light stimulation causes an olfactory impairment, which was reflected in the animals spending more time to accomplish the test. Altogether these results suggest that microglia activation influences OB circuit configuration and physiology.

1. Introducción

1.1 El sistema olfatorio

La olfacción evolucionó hace 550 millones de años (Hawkes & Dowty, 2009), con la tarea principal de detectar y discriminar entre una inmensa variedad de “odorantes” (Mori, 2003; Su *et al.*, 2009), los cuales son compuestos volátiles con una masa molecular aproximada de 20-300 daltones (Firestein, 2001; Mori, 2003). Sin embargo, también hay odorantes no volátiles, generalmente de carácter soluble (Stowers & Marton, 2005; Hino *et al.*, 2009). Se han desarrollado dos sistemas olfatorios en la mayoría de los animales: *el sistema olfatorio principal*, que permite a los organismos encontrar comida, detectar depredadores/presas y marcar el territorio (Firestein, 2001; Purves *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2009). El segundo componente, llamado *sistema olfatorio accesorio*, permite la comunicación feromonal (Firestein, 2001; Stockhorst & Piertowsky, 2004), que participa en la identificación de congéneres y en la reproducción mediante la búsqueda de pareja (Song *et al.*, 2008).

A pesar de la relevancia de todas estas funciones, el sentido del olfato es normalmente considerado como un sentido primitivo (Kiernan, 2001; Hawkes & Dowty, 2009), ya que la transmisión de la información olfatoria inicial no requiere de un relevo talámico en su camino a la corteza cerebral (Hawkes & Dowty, 2009; Su *et al.*, 2009).

1.1.1 Organización Morfo-funcional del Sistema Olfatorio Principal

Se hipotetiza que más de 10000 olores pueden ser distinguidos por el ser humano (Hatt, 2004). La transducción olfatoria se produce gracias a que las moléculas odorantes son reconocidas por receptores especializados ubicados en la mucosa del epitelio olfatorio (Shepherd, 1972; Firestein, 2001; Mombaerts, 2004). El epitelio olfatorio se encuentra en el interior de las fosas nasales, sobre la parte inferior de la

lámina cribosa del hueso etmoides del tabique nasal (Haines, 2006). Para discriminar entre una gran variedad de odorantes, los mamíferos han desarrollado cerca de 1000 tipos de estos receptores odorantes especializados (Mori, 2003; Nagayama *et al.*, 2014), los cuales son proteínas con siete segmentos transmembranales acopladas a proteínas G que son expresadas preferencialmente en los cilios de células receptoras olfatorias conocidas como neuronas sensoriales olfatorias (NSO) (Firestein, 2001; Mori, 2003; Song *et al.*, 2008). Solamente un tipo de proteína receptora, de una amplia variedad codificada por diferentes genes (Mombaerts, 2004; De María & Ngai, 2010), está presente en la membrana de una NSO dada (Doty & Kamath, 2014).

La cantidad de NSO que se activan ante la presencia de un estímulo odorante es dependiente de la concentración de este (Kandel *et al.*, 2001). Además, las NSO son capaces de sentir a distintos odorantes (Kandel *et al.*, 2001), aunque éstas son activadas preferencialmente por uno sólo (Araneda *et al.*, 2000). De manera general, se puede decir que el campo receptivo de una NSO lo conforma el conjunto de moléculas capaces de activar a su receptor olfatorio particular (Araneda *et al.*, 2000).

Además de las NSO, también existen otros dos tipos celulares adicionales en el epitelio olfatorio, las células de soporte y las células madre (Firestein, 2001; Ojeda, 2004; Song *et al.*, 2008), también conocidas como células basales (Afifi & Bergman, 1999). Las células basales se encargan de reemplazar a las NSO, quienes presentan un promedio de vida de 45 días (Kandel *et al.*, 2001); debido a esto, existe una regeneración frecuente de las NSO para mantener constante su población (Hawkes & Dowty, 2009). En el epitelio olfatorio también se encuentran las glándulas de Bowman, que confieren humedad a través de la secreción de moco (Afifi & Bergman, 1999) y que generan enzimas que sirven para metabolizar los agentes externos absorbidos en la mucosa (Hawkes & Dowty, 2009).

Como ya se mencionó, la transducción en las NSO comienza con la unión del odorante a su receptor (Kandel *et al.*, 2001; Purves *et al.*, 2008), lo que lleva a la activación de una proteína Golf (Firestein, 2001) que induce, a su vez, la

activación de un sistema de transducción que finalmente provoca una despolarización de la membrana en la NSO y que, eventualmente, genera potenciales de acción (De María & Ngai, 2010). Las NSO tienen una morfología de tipo bipolar y la transducción de la señal olfatoria se lleva a cabo principalmente en su región apical (Carpenter, 1994; Firestein, 2001). Estas neuronas presentan en los extremos apicales de su única dendrita una serie de 20-30 cilios muy finos orientados hacia la superficie exterior del epitelio (Kandel *et al.*, 2001; Purves *et al.*, 2008), donde se lleva cabo la transducción de la señal olfatoria (Kandel *et al.*, 2001; Purves *et al.*, 2008). Además, las NSO presentan un axón amielínico muy delgado (0.2 μm de diámetro) (Haines, 2006) que transmite la información olfatoria hacia el bulbo olfatorio (BO) (Firestein, 2001). Los nervios olfatorios (primer par craneal) se conforman por el conjunto de axones provenientes de las distintas NSOs del epitelio olfatorio, los cuales tienen que cruzar la membrana basal epitelial (Ojeda, 2004) y la lámina cribosa del etmoides para llegar hasta la superficie inferior del lóbulo frontal (Crossman & Neary, 2007), específicamente al BO (Firestein, 2001; Kandel *et al.*, 2001) (Fig. 1).

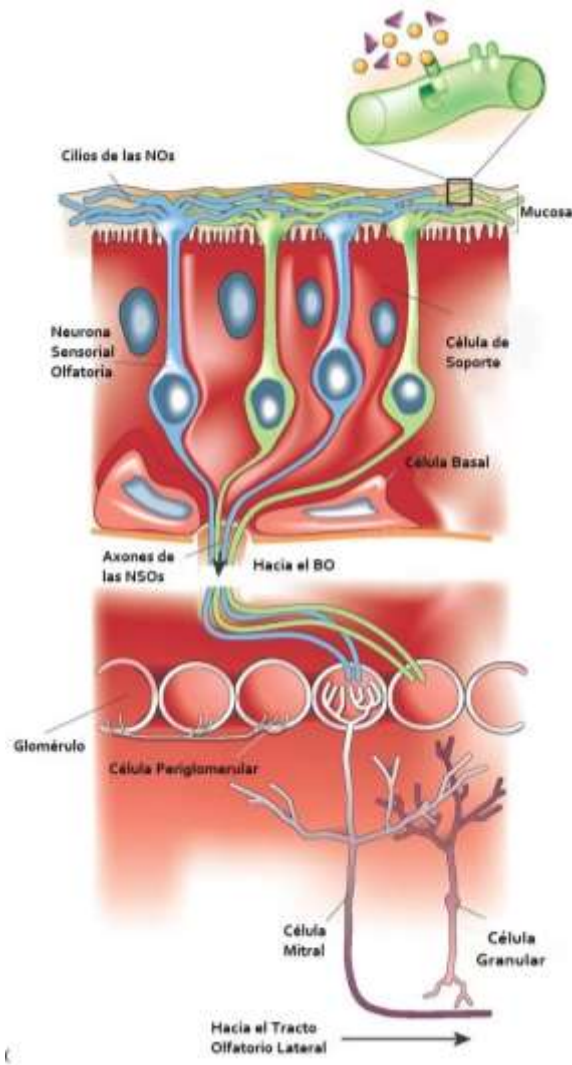


Figura 1. Anatomía de la entrada sensorial olfatoria.

La información olfatoria se desencadena cuando la molécula odorante se une a los receptores que son expresados en los cilios de las Neuronas Sensoriales Olfatorias (NSOs). Esta información es transducida y viaja a través los axones de las NSOs, cuyos axones forman los nervios olfatorios y que tienen que atravesar la lámina cribosa del hueso etmoides para llegar hasta los glomérulos del BO. En el epitelio olfatorio también se encuentran *células madre* o *células basales*, cuyo papel es reemplazar constantemente a las NSOs, así como las células de Soporte, que se encargan de mantener las condiciones iónicas adecuadas para que la transducción olfatoria se lleve a cabo. En los glomérulos del BO, se encuentran las dendritas de las neuronas de segundo orden y de proyección: *las células mitrales* y *las células empenachadas*, cuya actividad excitatoria es modulada por un conjunto de interneuronas granulares. Además, en la localidad de los glomérulos se encuentran varios tipos de interneuronas, como las células periglomerulares, que se encargan de modular la entrada sensorial, la actividad de las neuronas de proyección, así como de establecer contactos con otros glomérulos. *Modificado de Firestein, 2001.*

1.1.2 El bulbo olfatorio (BO)

El BO es el primer centro de relevo en la vía transduccional olfatoria en el sistema nervioso central (SNC) (Hawkes & Dowty, 2009). Esta estructura se encuentra conformada por 7 capas (Chen & Shepherd, 2005) que se describen a continuación.

Como ya se mencionó, los nervios olfatorios se conforman por los axones de las NSOs, mismos que viajan desde el epitelio olfatorio (Ojeda, 2004) y componen la

primera capa del BO, la capa de los *nervios olfatorios o fascículos* (Hawkes & Doty, 2009).

Las NSOs que expresan el mismo receptor, envían axones a uno, dos o hasta tres glomérulos (Mombaerts, 2004), que son estructuras esféricas de 100-200 μm de diámetro que se componen de las terminales axónicas de las NSOs y de las dendritas apicales de las neuronas de segundo orden, es decir, las neuronas mitrales y las empenachadas (Shepherd *et al.*, 2004; Purves *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2009). Los glomérulos también contienen interneuronas GABAérgicas (Willhite *et al.*, 2006). Un odorante activa un repertorio de NSOs dependiendo de su naturaleza y concentración para, consiguientemente, activar a un grupo específico de glomérulos (Bozza *et al.*, 2002).

Los glomérulos suelen estar situados estereotípicamente en el BO (Mombaerts, 2004) y conforman la *capa glomerular*. Las neuronas intrínsecas de la capa glomerular, conocidas como células yuxtglomerulares (Hawkes & Doty, 2009), son interneuronas que no inervan regiones cerebrales fuera del BO (Nagayama *et al.*, 2014). Estas interneuronas son heterogéneas morfológicamente y se conocen tres tipos: las células periglomerulares, las células de axón corto y las células empenachadas externas (Nagayama *et al.*, 2014). Las células periglomerulares son las más abundantes en esta capa (Parrish-Aungst *et al.*, 2007) y tienen el cuerpo celular más pequeño de los tres tipos de interneuronas (5-10 μm) (Nagayama *et al.*, 2014). Existen tres subtipos de neuronas periglomerulares, según la expresión diferencial de la tirosina hidroxilasa (Nagayama *et al.*, 2014) y de proteínas de unión a Ca^{2+} como la calretinina y la calbindina (Kosaka & Kosaka, 2007). Las células periglomerulares proyectan sus dendritas a un sólo glomérulo y algunas veces a varios de ellos; estas interneuronas pueden presentar axones que se extienden hasta 5 o 6 glomérulos (Pinching & Powell, 1971). Las células de axón corto se encargan de comunicar varios glomérulos en la superficie del BO (Shepherd, 2004), ya que tienen dendritas que se encuentran en el espacio interglomerular y un axón que se dirige hacia 1-2 glomérulos (Pinching & Powell, 1971). El soma de estas células es más grande que el de las células

periglomerulares, y mide aproximadamente 8-12 μm (Pinching & Powell, 1971). Las células que presentan el soma más grande de los tres tipos de interneuronas glomerulares, son las células empenachadas externas, con un diámetro de 10-15 μm (Pinching & Powell, 1971). A diferencia de las células periglomerulares, las empenachadas externas ocupan un volumen muy grande de los glomérulos y sus dendritas se dirigen hacia 1-2 glomérulos (Ennis & Hayar, 2008).

La *capa plexiforme externa* (EPL, por sus siglas en inglés) contiene muy pocos cuerpos celulares, pero está formada por las dendritas de las células granulares y numerosas dendritas de las células mitrales y empenachadas (Hawkes & Doty, 2009; Imai, 2014) que, como ya se mencionó, son conocidas también como neuronas principales o neuronas de proyección (Haines, 2006; Fukunaga *et al.*, 2014). Las dendritas apicales de las neuronas de proyección se dirigen hacia los glomérulos para establecer contactos con las terminales axónicas de las NSOs (Hawkes & Doty, 2009; Li *et al.*, 2014). Por otra parte, las dendritas basales de las neuronas de proyección establecen contactos con otro tipo de interneuronas, las neuronas granulares (Hawkes & Doty, 2009). El contacto que establecen las neuronas principales con las células granulares se realiza mediante sinapsis dendrodendríticas (Purves *et al.*, 2008; Rojas-Líbano & Key, 2008; Imai, 2014; Fukunaga *et al.*, 2014). Existen aproximadamente 50-100 células granulares por cada célula mitral (Hawkes & Doty, 2009), y cada una de ellas puede establecer contactos sinápticos de manera recíproca con varias neuronas de proyección (Hawkes & Doty, 2009).

Los somas de las células mitrales se encuentran en una capa delgada denominada *capa mitral* (Shepherd *et al.*, 2004), que se encuentra de manera adyacente a la capa plexiforme externa (Hawkes & Doty, 2009). El BO recibe un número muy grande de fibras centrífugas desde la corteza primaria olfatoria (Imai, 2014), así como de estructuras externas a esta corteza (Zaborsky *et al.*, 1986). Las fibras centrífugas terminan en la capa plexiforme externa, la capa plexiforme interna y la capa glomerular (Shepherd *et al.*, 2004; Hawkes & Doty, 2009). La *capa plexiforme interna* (IPL, por sus siglas en inglés), ubicada justo por debajo de la

capa de células mitrales, se compone por axones mielinizados de las células mitrales y empenachadas (Nagayama *et al.*, 2014). En esta capa también se hallan las dendritas ascendentes de las neuronas granulares (Nieuwenhuys *et al.*, 2008).

Las células granulares son las más numerosas dentro del BO (Hawkes & Doty, 2009), son relativamente pequeñas (6-8 μm) (Nagayama *et al.*, 2014), carecen de axón y su soma se ubica en la parte medial de *la capa de células granulares* (Shepherd *et al.*, 2004). En la capa granular convergen axones y colaterales de las células de proyección, así como la mayoría de las fibras centrífugas (Haines, 2006; Hawkes & Doty, 2009).

En la última capa del BO, llamada *core* (la zona más central del BO) (Bardy *et al.*, 2010) convergen los axones descendentes de las neuronas mitrales y empenachadas que viajan a través del tracto olfatorio (Nieuwenhuys *et al.*, 2008).

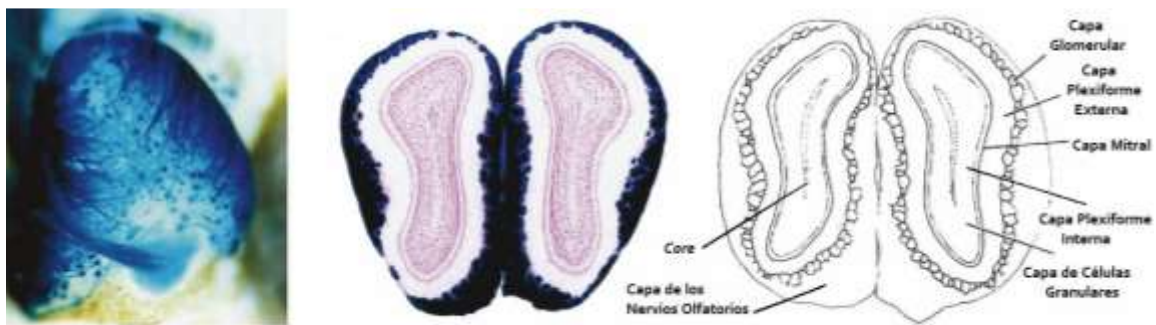


Figura 2. Organización anatómica del Bulbo Olfatorio (BO)

Los fascículos que conforman los axones teñidos en azul provenientes del epitelio olfatorio llegan a distintos glomérulos en el BO (micrografía de la izquierda). Las capas del BO están conformadas en este orden: la capa de nervios olfatorios, la capa glomerular, la capa plexiforme externa, la capa mitral, la capa plexiforme interna, la capa de células granulares y el *core* (tinción de X-Gal; contrateñida con rojo neutro en corte coronal -micrografía central- ; figura a la derecha: esquema). Modificado de Mombaerts, 1996.

1.1.3 Actividad eléctrica del bulbo olfatorio

La actividad coordinada de las poblaciones neuronales se ve reflejada en oscilaciones rítmicas de los potenciales de campo local (LFPs, por sus siglas en

inglés) (Rall and Shepherd 1968; Beshel *et al.*, 2007; Rojas-Líbano & Kay, 2008; Fourcaud–Trocmé *et al.*, 2014). Esta actividad sincrónica en el BO se asocia con el procesamiento de la información olfatoria (Adrian, 1942). Los LFPs reflejan fluctuaciones regulares de los potenciales pre- y postsinápticos y de los potenciales de acción de varias neuronas locales adyacentes (Buzsáki *et al.*, 2012), por lo que podría decirse que son una medida global de la dinámica eléctrica de una población neuronal (Adrian, 1942; Buzsáki *et al.*, 2012). La potencia y la periodicidad de las oscilaciones de los LFPs del BO varían con el grado de acoplamiento de las neuronas de proyección con el resto de la población neuronal del BO (Eckman & Freeman, 1990).

La actividad oscilatoria del BO comprende una banda amplia de frecuencias que van desde 1 Hz hasta 150 Hz (Martin & Ravel, 2014). Tres tipos de ritmos oscilatorios han sido descritos en el BO *in vivo* (Kay, 2014) (Fig. 3). Estos incluyen a las oscilaciones de alta frecuencia, el ritmo gamma (γ), que se manifiestan con frecuencias de ~40–100 Hz (Kay *et al.*, 2009; Lepousez & Lledo, 2013; Fukunaga *et al.*, 2014; Kay, 2015), mismas que han sido correlacionadas con la discriminación fina de olores (Beshel *et al.*, 2007; Rojas-Líbano & Kay, 2008; Fourcaud-Trocmé *et al.*, 2014; Gschwend *et al.*, 2015); asimismo, se les ha asociado con otras tareas como el procesamiento perceptual del olor y el aprendizaje olfatorio (Gschwend *et al.*, 2015). Asimismo, las tareas de percepción y procesamiento cognitivo del estímulo olfatorio están asociadas al ritmo beta (β), (~15–30 Hz) (Beshel *et al.*, 2007; Ravel *et al.*, 2007; Rojas-Líbano & Kay, 2008; Kay *et al.*, 2009; Bekkers & Susuki, 2013). Por otra parte, el ritmo theta (θ), el más lento de todos los ritmos bulbares, con frecuencias de ~1-12 Hz (Rojas-Líbano & Kay, 2008; Kay *et al.*, 2009; Fukunaga *et al.*, 2014), se encuentra asociado con la respiración (Kay, 2005, Fourcaud–Trocmé *et al.*, 2014) y la intensidad de los estímulos olfatorios (Kay *et al.*, 2009; Martin & Ravel, 2014). Este ritmo lento es generado por la sincronización entre las neuronas de proyección y las interneuronas periglomerulares del BO (Fukunaga *et al.*, 2014).

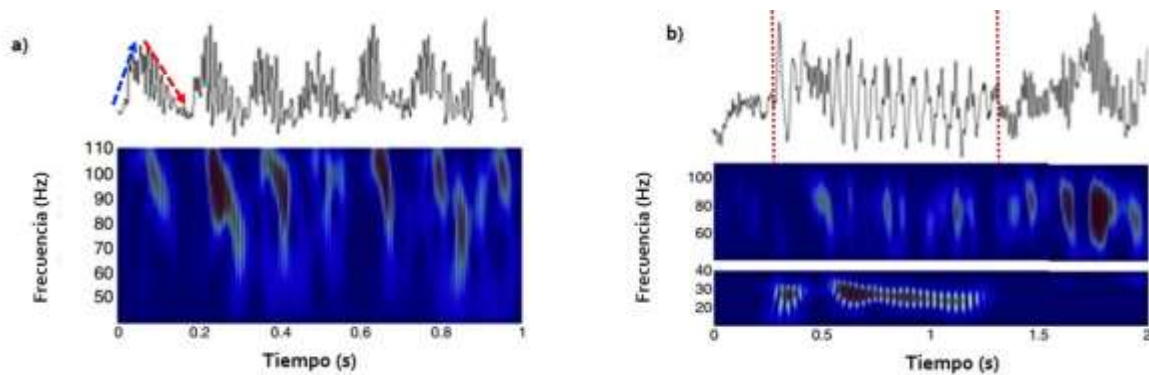


Figura 3.- Oscilaciones del potencial de campo local (LFP, por sus siglas en inglés) en el BO *in vivo*. a) Ritmos gamma y theta del BO de una rata. En el panel de arriba se muestran el trazo del LFP en siete ciclos respiratorios. La oscilación theta está estrechamente relacionada con el ciclo respiratorio, la fase ascendente de la oscilación theta corresponde a la inspiración (flecha azul) mientras que la fase descendente corresponde a la espiración (flecha roja). El ritmo gamma comienza en el pico del ritmo theta con oscilaciones de alta frecuencia. En el panel de abajo se muestra el espectrograma correspondiente a la banda gamma. b) Ejemplo de los ritmos beta y gamma registrados de un BO de ratón en respuesta al olfateo ante un odorante volátil; las líneas punteadas en rojo delimitan la duración de la exposición al odorante. En el panel de abajo se muestran los espectrogramas en las bandas beta y gamma. Modificado de Kay, 2015.

La dinámica de las oscilaciones del BO depende del grado de acoplamiento de las neuronas principales, las células mitrales y empenachadas, con los otros tipos celulares del BO (Eckman & Freeman, 1990), principalmente con las interneuronas bulbares (Fukunaga *et al.*, 2014). De modo que la actividad que se genera durante los patrones oscilatorios bulbares es dependiente de las sinapsis excitatorias y de las sinapsis inhibitorias, comúnmente a través de interacciones dendrodendríticas y recíprocas, dentro del BO (Lepousez & Ledo, 2013).

Como se mencionó, en la vía de transducción olfatoria, las neuronas de segundo orden, las neuronas mitrales y empenachadas, reciben la señal proveniente de las terminales axónicas de las NSOs (Li *et al.*, 2014). Las neuronas de proyección continúan la transmisión de la información mediante la liberación del neurotransmisor glutamato (Glut) (Haines, 2006; Fukunaga *et al.*, 2014). En la parte basal de estas neuronas, sus dendritas hacen contacto con las interneuronas de tipo granular en la capa plexiforme externa del BO, activándolas mediante la liberación dendrítica del Glut (Nagayama *et al.*, 2014). En esta instancia, las sinapsis dendrodendríticas entre las células de proyección con las células granulares son mediadas por los receptores NMDA y AMPA, pero el receptor NMDA es

particularmente esencial para este proceso (Christie *et al.*, 2001; Isaacson & Vitten, 2003). Por su parte, las células granulares son interneuronas de tipo GABAérgicas (Imai, 2014), es decir, que utilizan el neurotransmisor gamma ácido y-aminobutírico (GABA) (Carpenter, 1994) para inhibir a las neuronas principales, ya que estas últimas expresan receptores de tipos GABA_A y GABA_B (Isaacson & Vitten, 2003). Dada la naturaleza de estos tipos celulares, cuando una neurona de proyección activa a una interneurona granular mediante Glut (Shepherd *et al.*, 2004), ésta la inhibe de manera recíproca mediante la liberación de GABA en un mecanismo conocido como “inhibición *feedback*” (Fukunaga *et al.*, 2014). Otro mecanismo por el cual estas sinapsis dendrodendríticas tienen efecto en la configuración del circuito bulbar, es la “inhibición lateral”, misma que ocurre cuando las células granulares activadas por las células principales, inhiben a las neuronas de proyección aledañas (Wachowiak & Shipley, 2006; Arevian *et al.*, 2008; Fukunaga *et al.*, 2014). Se ha reportado recientemente, que las sinapsis dendrodendríticas entre las neuronas granulares y las neuronas de proyección tienen un papel importante en la generación de los ritmos de la banda gamma (Lagier *et al.*, 2004; Gschwend *et al.*, 2015) y que están implicadas en la modulación de la inhibición global del BO (Fukunaga *et al.*, 2014). Estas oscilaciones de alta frecuencia se producen debido al disparo repetitivo de las NSOs hacia las células principales, lo que resulta en dos eventos: la activación de las células granulares que provocan una inhibición constante de las neuronas principales, y la activación de las neuronas piramidales de la corteza olfatoria mediante el tracto olfatorio lateral (Rojas-Libano & Kay, 2008), mismas que, mediante una retroalimentación excitadora tipo *feedback*, proyectan de regreso hacia las neuronas granulares del BO (Tong *et al.*, 2014).

Por otra parte, durante la excitación-inhibición a nivel glomerular, se genera la “inhibición *feedforward*”, “anticipativa” o de “prealimentación” (Cleland & Sethupathy, 2006; Fukunaga *et al.*, 2014), debido a que las terminales nerviosas de las NSOs activan a las células periglomerulares, que inhiben, a su vez, a las neuronas principales (Fukunaga *et al.*, 2014). Alternativamente, se ha propuesto otro mecanismo de regulación *feedback* a nivel glomerular llamado “inhibición presináptica”, en la que las terminales de las NSOs, al activar a las células

periglomerulares adyacentes, propician que éstas inhiban de manera recíproca a los mismos axones de las NSOs, ya que éstos expresan receptores GABA_B (Imai, 2014). La dinámica de excitación-inhibición en los glomérulos, mediado por las células yuxtglomerulares (especialmente las periglomerulares) y las neuronas principales, tiene un papel importante en la orquestación del ritmo theta bulbar y que, por lo tanto, están implicadas en la modulación de la inhibición global bulbar (Fukunaga *et al.*, 2014).

1.2 La Microglía

Las células de la microglía son conocidas como “los *macrófagos del sistema nervioso central*”, pues son un tipo celular nervioso que puede generar respuestas de tipo inmune-innatas (Frost & Schafer, 2016). Además de tener un papel en la defensa inmune del SNC también se considera que estas células participan en el mantenimiento de la homeostasis del SNC de manera similar a los astrocitos (Ginhoux & Prinz, 2015). En el SNC maduro, estas células se distribuyen a través de todo el cerebro (Ginhoux & Prinz, 2015; Frost & Schafer, 2016) y presentan procesos ramificados cercanos entre ellas, pero sin tocarse entre sí, por lo que cada célula tiene un territorio anatómico-funcional exclusivo (McGeer & McGeer, 2008).

La microglía comprende entre el 5-10% del total de las células del SNC (McGeer & McGeer, 2008; Frost & Schafer, 2016). Las células microgliales nacen en el saco vitelino como progenitores eritromieloides, aproximadamente en el día embrionario 7.5, y migran dentro del cerebro en el día embrionario 9.5 (Bertrand *et al.*, 2005). Una vez en el cerebro, los precursores microgliales toman residencia y se renuevan a través de la vida adulta, con un mínimo remplazamiento desde la sangre (Ginhoux & Prinz, 2015).

Pío del Río Hortega, en el año de 1919, identificó a la microglía como un tipo celular mesodérmico que migra al SNC durante la vida embrionaria donde presenta capacidad fagocítica, lo que le permitió reconocer las similitudes funcionales y morfológicas entre la microglía y los monocitos (Del Río Hortega, 1919). De esta

manera, del Rio Hortega introdujo la descripción de la morfología de las células microgliales, a las cuales denominó como células “inactivas” en condiciones fisiológicas y cuyas características principales eran un soma pequeño (5-10 μm) y procesos celulares extendidos (Del Rio Hortega, 1919). Estas características definieron a la microglía en lo que se llamó su “estado de reposo” o “ramificada” (McGeer & McGeer, 2008). Sin embargo, trabajos recientes (Nimmerjahn *et al.*, 2005; Hanisch & Kettenmann, 2007), mediante preparaciones *in vivo* reportaron que la microglía no tiene “reposo”, y determinaron que a diferencia de lo que se pensaba, la microglía se encuentra en constante actividad y movimiento, incluso más que cualquier otra célula del cerebro adulto (Nimmerjahn *et al.*, 2005) (Fig. 4). Ahora se sabe que las células de la microglía extienden y retraen sus ramificaciones en una dinámica que les permite sensar su medio extracelular (Nimmerjahn *et al.*, 2005). A diferencia de la microglía “activa” (Rock *et al.*, 2004; McGeer & McGeer, 2008), la microglía ramificada no fagocita células, pero secreta moléculas (incluyendo las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de las clases I/II (Aloisi, 2001). La microglía en el estado ramificado es capaz de detectar amenazas inmunológicas mientras mantiene la homeostasis en el SNC (Davis *et al.*, 1994; Aloisi, 2001), además de que mantiene sus propiedades de proliferación celular y de diferenciación (Lawson *et al.* 1990; Perry 1998).

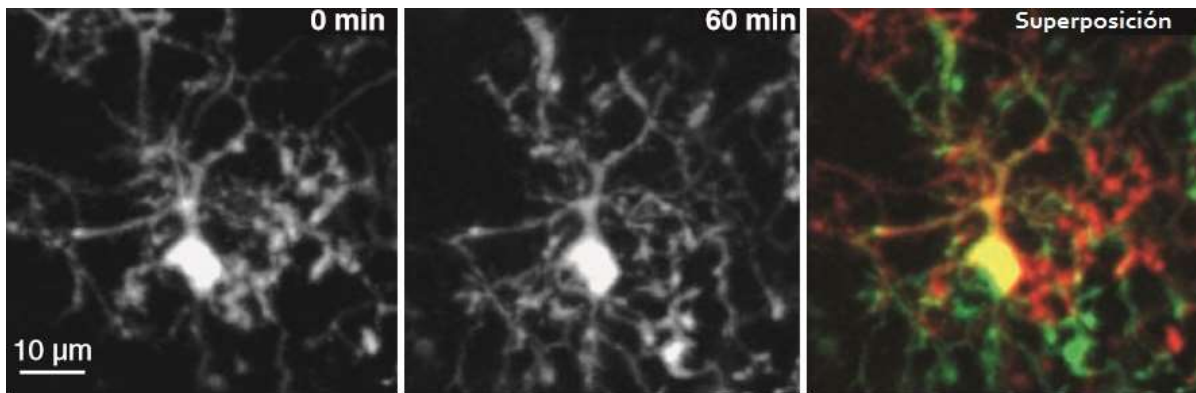


Figura 4.- La microglía ramificada (en reposo) es altamente dinámica. Las imágenes de microscopía de dos fotones muestran las proyecciones abundantes de una misma célula microglial al principio (izquierda) y 1 hora después (centro) del inicio de una serie fotográfica transcranial de tipo *time-lapse*. La imagen superpuesta (derecha) muestra la formación de extensiones (verde) y las retracciones (rojo) de los procesos microgliales después de 1 hora de grabación. *Modificado de Nimmerjahn et al., 2005.*

Además, se ha propuesto que la microglía no sólo elimina a agentes patógenos y tejido dañado, sino que también remueve conexiones débiles entre las neuronas (Perry *et al.*, 2010; Ginhoux & Prinz, 2015), por lo que se considera que tiene un papel importante en el establecimiento, en el mantenimiento y en la función de las redes neuronales (Frost & Schafer, 2016). De hecho, se ha relacionado a la función normal de la microglía con la memoria (Bilbo *et al.*, 2005; Williamson *et al.*, 2011), el aprendizaje (Parkhust *et al.*, 2013) y el control motor (Derecki *et al.*, 2012; Parkhust *et al.*, 2013).

Estudios recientes de imagenología demuestran que la microglía fagocita células muertas durante el desarrollo del cerebro (Frost & Schafer, 2016), debido a que la colonización de los precursores microgliales ocurre antes de la diferenciación de otras células residentes del SNC. Como resultado, la microglía tiene un papel importante en el desarrollo del SNC (Bessis *et al.*, 2007; Frost & Schafer, 2016).

La microglía puede responder rápidamente a las alteraciones de la homeostasis causada por heridas o lesiones (Gehrmann *et al.*, 1995; Kreutzberg, 1996; Dheen *et al.*, 2007), por patogénesis (Kreutzberg, 1996; Stoll & Jander, 1999; Streit, 2002), por enfermedades neurodegenerativas (Dickson *et al.*, 1993; Stoll & Jander, 1999; Streit, 2002; Streit, 2004; Dheen *et al.*, 2007) y por tumores cerebrales (Kreutzberg, 1996). Bajo estas condiciones, la microglía presenta cambios morfológicos y funcionales que la llevan a un estado “activo” en el que se distingue como microglía fagocítica (Stoll & Jander, 1999; Kim & Vallis, 2005). La característica morfológica principal de la microglía “activa” es su forma ameboide, que la convierte en una célula grande y redonda (Streit, 2004; Kim & Vallis, 2005). Además de la fagocitosis (Stoll & Jander, 1999; Kim & Vallis, 2005), la activación de la microglía promueve la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Kreutzberg, 1996; Kim & Vallis, 2005), la presentación de antígenos (Nimmerjahn *et al.*, 2005; Hanisch & Kettenmann, 2007; Kettenmann *et al.*, 2011; Doorn *et al.*, 2014) y la expresión de factores neurotróficos (Kreutzberg, 1996; van Rossum & Hanisch, 2004). La microglía puede ser activada mediante una variedad diversa de factores,

incluyendo: cambios en el ATP, el glutamato y el K⁺ extracelular (indicativo de la ruptura de células) (Gehrmann *et al.*, 1995) y diversas moléculas involucradas en la señalización inflamatoria (Cheng *et al.*, 2016).

En general, la respuesta inflamatoria en el SNC, mediada por la microglía, involucra la producción de moléculas de adhesión (Raivich *et al.*, 1999), citocinas pro-inflamatorias como el interferón gamma (IFN- γ) (Wood, 2003), la interleucina 1 Beta (IL-1 β), la interleucina 1 Ipha (IL-1 α) y el factor de necrosis tumoral alpha (TNF α , por sus siglas en inglés) (Wood, 2003; Cheng *et al.*, 2016). Otras moléculas pro-inflamatorias producidas por la microglía son las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que normalmente se liberan ante un daño celular tales como el superóxido, los peróxidos (Block *et al.*, 2007) y el óxido nítrico (NO), producido por la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS, por sus siglas en inglés); así como las prostaglandinas, sustancias lipídicas producidas por la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2, por sus siglas en inglés) (Cheng *et al.*, 2016). Asimismo, la activación de la microglía también desencadena la producción de neuromoduladores como la adenosina (Lauro *et al.*, 2010) y el ATP (Dissing-Oelsen *et al.*, 2014) los cuales son reconocidos mediante una variedad de receptores purinérgicos (Rock *et al.*, 2004). Además de éstos, la sensibilidad de la microglía a su ambiente se debe a la acción de otros receptores como receptores para inmunoglobulinas y quimiocinas, como por ejemplo el receptor a la fractalquina (conocida también como CX3CL1, una citocina pequeña de función quimiotáctica considerada como el único miembro de la familia de quimiocinas CX3C) (van Rossum & Hanisch, 2004) Raivich *et al.*, 1999). La liberación de citocinas y quimiocinas por parte de la microglía se debe a que expresa moléculas del MHC I/II (Kim & Vallis, 2007), cuya activación desencadena un proceso inflamatorio que es capaz de reclutar a otras células gliales como los astrocitos, y otras células de la microglía (Aloisi, 2001), neuronas y células T (Gehrmann *et al.*, 1995). Debido a esto, la interacción entre microglía y otros tipos celulares puede inducir el fenómeno de acumulación de microglía y astrocitos reactivos (Rock *et al.*, 2004). Muchos de los receptores de quimiocinas también son expresados en astrocitos, lo cual sugiere que las quimiocinas pueden funcionar como señales de comunicación entre la

microglía y los astrocitos (Rock *et al.*, 2004). También se ha sugerido la idea de que la comunicación astrocito-microglía puede darse mediante la interacción a través de ATP con los receptores purinérgicos de la microglía (Verderio *et al.*, 2001). Todo lo anterior sugiere que la actividad microglial puede tener influencia en múltiples funciones relacionadas con otros tipos celulares y recibir retroalimentación de éstos (Aloisi, 2001).

La microglía también puede presentar una respuesta inmune debido a la activación de receptores de moléculas asociadas a patógenos, tales como los Receptores de Tipo *Toll* (TLR, por sus siglas en inglés) (Wang *et al.*, 2013). Los TLRs reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (Wang *et al.*, 2013), expresados en agentes infecciosos y que median la producción de citoquinas provocando una actividad inmune (Curry *et al.*, 2003). Los seres humanos presentan 10 tipos de TLRs funcionales: TLR1-10 (Roach *et al.*, 2005), mientras que 12 tipos han sido identificados para el ratón: TLR1-10, TLR11 y TLR13 (Roach *et al.*, 2005). Entre ellos, el receptor TLR2 es capaz de reconocer compuestos de las bacterias Gram-positivas en conjunto con el receptor TLR6 como un heterodímero (Wang *et al.*, 2013) y cuyos agonistas más conocidos son los lipopéptidos sintéticos Pam2CSK4 (Mancini *et al.* 2011) y MALP-2 (Wang *et al.*, 2013).

1.2.1 La influencia de la microglía en la función de los circuitos neuronales

Durante mucho tiempo, las células gliales han sido consideradas como elementos pasivos en el cerebro (Araque *et al.*, 1999), proveyendo soporte estructural y metabólico a las neuronas debido a que no se comunican mediante impulsos eléctricos (Figueiredo *et al.*, 2011). Sin embargo, en los últimos años se ha confirmado que las células gliales son elementos que pueden sentir y responder a la actividad neuronal involucrándose en el procesamiento de la información (Araque *et al.* 1999). Por ejemplo, los astrocitos son capaces de regular la actividad neuronal y la transmisión sináptica (Pascual *et al.*, 2005) a través de su contacto con numerosas sinapsis (Bushong *et al.*, 2002). Este tipo celular puede tener respuestas moduladoras debido a cambios transitorios del Ca^{2+} intracelular que llevan a la liberación de gliotransmisores que modulan la actividad de los circuitos neuronales

(Gourine *et al.*, 2010; Figueiredo *et al.*, 2011). Los astrocitos alteran la actividad de los circuitos neuronales de diversas maneras (Figueiredo *et al.*, 2011). Por ejemplo, modifican la configuración de las redes neuronales mediante la liberación de "gliotransmisores", tales como el adenosin trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés), el glutamato y el co-factor D-serina (Magistretti, 2006). El incremento o el decremento de la producción de lactato, un sustrato crucial en la comunicación astrocito-neurona (Magistretti, 2006) y cambios en la señalización mediante prostaglandinas (Gordon *et al.*, 2007) también participan en la modulación de los circuitos neuronales por los astrocitos. Actualmente, este papel de los astrocitos en la actividad neural ha conferido importancia a la conceptualización de la sinapsis como una unidad "tripartita" (Araque *et al.*, 1999).

Durante los últimos años, se ha generado evidencia de que la microglía ramificada también puede controlar los circuitos neuronales en condiciones no inflamatorias (Wake *et al.*, 2013). Por ejemplo, la microglía es capaz de contactar segmentos iniciales de los axones (Nimmerjahn *et al.*, 2005) y zonas pre y post-sinápticas dada la extensión de sus ramificaciones en una manera dependiente de la actividad neuronal (Wake *et al.*, 2009; Tremblay *et al.*, 2010). También, puede remover sinapsis débiles (Nimmerjahn *et al.*, 2005), mediante un proceso denominado *pruning* sináptico que ocurre normalmente durante el desarrollo (Paolicelli *et al.*, 2011, Schafer *et al.*, 2012). En la edad adulta, este mismo fenómeno está involucrado en la neuroplasticidad (Davalos *et al.*, 2005; Nimmerjahn *et al.*, 2005; Kettenmann *et al.*, 2011). Como ya se dijo, la microglía puede responder a la liberación de neuromodulares como el ATP y la adenosina (Gourine *et al.*, 2010), produciendo una retroalimentación positiva de liberación de más ATP y adenosina para comunicarse con los astrocitos y las neuronas, lo que sugiere su participación en la actividad sináptica (Pascual *et al.*, 2012).

De manera interesante, en nuestro laboratorio, se evaluó el papel de la microglía en la generación del ritmo respiratorio (Lorea-Hernández *et al.*, 2016). Los resultados reportados sugieren que la microglía modula la generación de la actividad respiratoria por el complejo pre-Bötzinger (circuito neuronal encargado de

la generación del ritmo respiratorio) (Lorea-Hernández *et al.*, 2016), cuya alteración puede ser una causa importante del Síndrome de Muerte Súbita del Lactante (SMSL) (Harper, 2000). Esta modulación es ejercida no sólo en condiciones pro-inflamatorias, sino que los resultados muestran un papel crucial de la microglía dentro del mantenimiento de la actividad del complejo pre-Bötzinger y presenta evidencias de que en condiciones patológicas, la microglía podría participar en los procesos que repercuten en la depresión de la actividad respiratoria (Lorea-Hernández *et al.*, 2016). Por otro lado, de manera fisiológica, la microglía podría ser responsable de la dinámica adecuada del complejo pre-Bötzinger, ya que la inhibición de la actividad microglial o su "depleción", disminuye la generación de la actividad rítmica el complejo pre-Bötzinger en condiciones normales (Lorea-Hernández *et al.*, 2016).

1.2.1.1 La influencia de la microglía en la configuración de los circuitos neuronales del BO

Debido a la relevancia que tiene la dinámica de la microglía en los circuitos neuronales, se mencionarán brevemente los estudios realizados en el BO a este respecto. El BO es una estructura altamente plástica que puede cambiar la configuración de sus circuitos dependiendo de la información de entrada sensorial que reciba (Denizet *et al.*, 2016). Para conocer cómo la microglía está involucrada en el *pruning* sináptico tanto en el SNC maduro como en el desarrollo, muy recientemente se han llevado a cabo estudios de este proceso en el BO, en donde cabe mencionar, existe una neurogénesis importante que contribuye sustancialmente a la modulación de la circuitería olfatoria (Ribeiro *et al.*, 2015, Denizet *et al.*, 2016; Grier *et al.*, 2016). La zona subventricular (SVZ, por sus siglas en inglés) es conocida ampliamente como una zona cerebral importante en la que tiene lugar la neurogénesis de las células del BO (Lois & Álvarez-Buylla, 1994; Doetsch *et al.*, 1997). Esta zona se encuentra ubicada en la pared lateral del ventrículo se constituye de las células ependimarias que están en contacto directo con el ventrículo y que forman una monocapa a lo largo del ventrículo, mezcladas con células gliales conocidas como células tipo B, las cuales dan lugar a las tipo C

(de amplificación transitoria y alta proliferación (Lim & Álvarez-Bullya, 2016). Las células tipo C dan lugar a las tipo A, quienes son los auténticos neuroblastos migratorios (Lim & Álvarez-Bullya, 2016) . La migración de los neuroblastos inicia en la SVZ a partir de donde los neuroblastos generados viajan alineados formando cadenas con ayuda de las células tipo B, que los envuelven y facilitan su ruta a través de la corriente migratoria rostral (RMS, por sus siglas en inglés) para entrar al BO (Altman *et al.*, 1967; Lim & Álvarez-Bullya, 2016). En el BO, los neuroblastos se dispersan radialmente en forma de células individuales y an lugar a poblaciones de interneuronas maduras granulares y periglomerulares (Lois & Álvarez-Buylla, 1994). Dado el interés en el papel que juegan las células gliales en el proceso de neurogénesis del BO, Ribeiro y su equipo de trabajo reportaron en 2015, que la microglía residente en la SVZ y en la RMS, incluyen distintos fenotipos de efectores inmunes que se adaptan selectivamente al soporte y la dirección de la integración neuronal dentro de la circuitería olfatoria. Cuando se realizó la depleción de la microglía *in vivo*, se evidenció una disminución en la supervivencia y la migración de los neuroblastos generados recientemente hacia la capa granular del BO, lo que indica que una subpoblación de la microglía es necesaria para el mantenimiento de la circuitería olfatoria (Ribeiro *et al.*, 2015).

De manera similar, en 2016, Denizet y colaboradores mostraron que la microglía también tiene un papel importante en el mantenimiento de la población de las neuronas recién incorporadas y maduras en el BO, y que este proceso es dependiente de la actividad. Sus resultados mostraron que la microglía es capaz de fagocitar partes de las neuronas y reducir la densidad de espinas dendríticas en neuronas granulares nuevas del BO sano del ratón adulto (Denizet *et al.*, 2016). Ellos reportaron que después de inducir la deprivación sensorial mediante la administración de Dichlobenil (Dichlo, un fármaco que induce la ablación del epitelio olfatorio, provocando una pérdida en la entrada sensorial olfatoria) (Lazarini *et al.*, 2012), se indujo un incremento en la fagocitosis de restos de las neuronas granulares, mediada por la microglía activa, que se asoció a una disminución de la densidad de las espinas dendríticas en estas neuronas nuevas adultas. Estos experimentos sugieren que la microglía está involucrada en el *pruning* sináptico y

celular, permitiendo un mecanismo de adaptación de las conexiones neuronales dada la experiencia sensorial (Denizet *et al.*, 2016). Concidentemente, se demostró que la deprivación sensorial olfatoria es capaz de inducir de manera similar, una disminución en la densidad de las neuronas dopaminérgicas de la capa glomerular del BO así como su densidad sináptica (Grier *et al.*, 2016). Esto se mostró como resultado de la oclusión unilateral de las narinas en los sujetos experimentales; tal aproximación indujo una reducción en la producción de dopamina y en la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH), así como una reducción en el número de neuronas dopaminérgicas, consistente con el aumento de la densidad microglial y una morfología de este tipo celular en estado activo, así como la inclusión de componentes enteros de las neuronas dopaminérgicas en el BO ocluido. Adicionalmente, mediante el uso de imagenología de 2 fotones y análisis histológicos, se evidenció que la pérdida de la entrada olfatoria alteró las interacciones microglía-neurona durante los momentos en los que las neuronas dopaminérgicas eran eliminadas (Grier *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren, en conjunto, un papel importante de la microglía en la eliminación de las neuronas enteras o componentes celulares individuales, así como en la eliminación de sinapsis en el BO, tanto a nivel tanto glomerular como granular, de manera dependiente de la actividad (Denizet *et al.*, 2016; Grier *et al.*, 2016).

1.2.1.2 La influencia de la microglía en la fisiología del BO y patologías asociadas a la inflamación

La vía olfatoria primaria es un blanco vulnerable a través del cual los microorganismos de la periferia podrían acceder hacia el SNC de manera fácil (Ginkel *et al.*, 2003; Herbert *et al.*, 2014). Por lo anterior, se han realizado estudios relacionados con las vías inflamatorias que pudieran inducirse como respuesta de la microglía ante la exposición de agentes patógenos o daños en la entrada sensorial olfatoria (Herbert *et al.*, 2014). Se ha reportado que dentro de estas respuestas se pueden incluir el incremento en los niveles de la IL-6 y el TNF α en el

BO (Herbert *et al.*, 2014), así como la expresión de la iNOS en el epitelio olfatorio (Harris *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha propuesto también que en respuesta a heridas o daños, la microglía en el BO puede servir como un sensor o modulador de la inflamación cerebral mediante la activación del receptor TLR2 (Hérbert *et al.*, 2009). Además, en comparación con otras regiones del cerebro, la microglía del BO expresa mayor cantidad de ARN mensajero que codifica para moléculas que median la inflamación. Lo anterior indica que la microglía tiene un papel muy importante en la protección inmune del BO. (Doorn *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha demostrado que la IL1- β está presente de manera abundante en el BO del cerebro sano de ratas en edades posnatales (Lim & Brunjes, 1999). De manera similar, se ha reportado que en condiciones normales existe una expresión alta de CD68 en el BO (Doorn *et al.*, 2015). El CD68 es un marcador de la microglía activa (Holness & Simmons, 1993). Por su parte, la IL1- β ejerce un papel crucial en la microglisis bulbar (Vroon *et al.*, 2007). Una explicación viable para la presencia de estos marcadores en el BO es que la microglía activa tenga una función importante ante la ejecución de tareas olfatorias (Doorn *et al.*, 2015). Estos datos conducen a la hipótesis de que la expresión incrementada de marcadores de la microglía activa del BO, confiere al BO la capacidad de estar “preparado” ante algún insulto (Doorn *et al.*, 2015). Lo anterior es relevante, pues la exposición continua de las vías olfatorias al ambiente exterior puede contribuir a que las células microgliales se encuentren en un estado de alerta, capaz de responder a posibles cambios en la homeostasis o cuando se realiza una tarea olfatoria activa como la discriminación (Doorn *et al.*, 2015). Consistentemente con la importancia de la microglía en el mantenimiento de la homeostasis olfatoria, existen estudios en los que se ha demostrado que la inhibición (Erblich *et al.*, 2011) o la sobre-activación de la microglía puede incidir en deficiencias olfatorias (Seo *et al.*, 2014). En este sentido, la hiposmia (la capacidad olfatoria disminuida) puede ser inducida gracias a la producción de citocinas inflamatorias (Seo *et al.*, 2014), ya que la inducción de la activación de la microglía puede provocar la pérdida de la capacidad olfativa (Lalancette-Hébert *et al.*, 2009; Kirsten *et al.*, 2011). De manera interesante, se ha reportado que los niveles exacerbados de factores pro-inflamatorios tanto en el cerebro, como el BO (Doorn

et al., 2015; Seo *et al.*, 2014), se presentan durante enfermedades neurodegenerativas (Doorn *et al.*, 2015) y que la disfunción olfatoria es común en patologías como la enfermedad de Parkinson (Doty *et al.*, 2012), la enfermedad de Alzheimer (Wilson *et al.*, 2009), el síndrome de Down (Mkeown *et al.*, 1996) y la enfermedad de Niemann- Pick (Seo *et al.*, 2014). Lo anterior, nos sugiere que la microglía es capaz de presentar una actividad pro-inflamatoria importante asociada a la neurodegeneración y que una de las funciones alteradas en esta condición patológica es la capacidad olfatoria (Doorn *et al.*, 2015; Seo *et al.*, 2014).

1.3 La Optogenética

La optogenética es una herramienta de alta resolución temporal que posibilita la estimulación o la inhibición de distintos tipos celulares mediante luz a diferentes longitudes de onda (Wang *et al.*, 2007; Deisseroth, 2011) y que ofrece mejores resultados que la estimulación eléctrica convencional (Boyden, 2011) o la activación farmacológica clásica (Deisseroth, 2011, Vargas, 2014). Dicho de otra manera, la optogenética permite el control óptico de distintos sistemas biológicos de manera específica y dirigida (Deisseroth, 2011; Rein & Deussing, 2011; Mattis *et al.*, 2012), lo que permite la ganancia o la pérdida de la función de un tipo celular en un tejido intacto (Chao & Li, 2016). Los mecanismos por los cuales se realiza la modulación optogenética son muy variados y, en los últimos años, se han desarrollado distintos elementos involucrados en la modulación de las células, tales como la expresión dirigida de opsinas (Deisseroth, 2011), la señalización mediada por receptores acoplados a proteínas G (Bernstein & Boyden, 2011; Koyanagi, & Terakita, 2013), la activación enzimática (Chow & Boyden, 2015) o interacciones proteína-proteína que finalmente tienen un efecto fisiológico en la célula dada la estimulación fótica (Chow & Boyden *et al.*, 2015) (Figura 5).

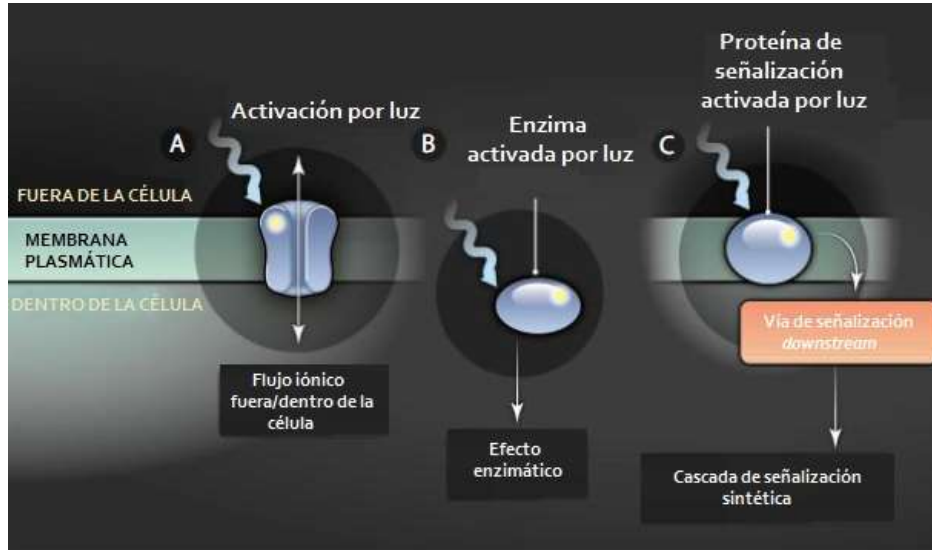


Figura 5. Herramientas moleculares optogenéticas. A) Las opsinas son proteínas transmembranales permeables a iones que se modulan por la estimulación con luz. B) También existen enzimas fotosensibles que presentan un efecto en otra proteína. Por ejemplo, la fusión entre Rac1 y un dominio LOV (PA-Rac1) habilita el control fótico de la conformación del citoesqueleto. C) La activación de vías de señalización por luz puede desencadenar una vía transduccional específica. Por ejemplo, las melanopsinas son proteínas acopladas a proteínas G que pueden ser moduladas mediante la estimulación fótica para activar distintas vías de señalización. (Modificado de Chow & Boyden *et al.*, 2015).

La optogenética posibilita la modulación de la actividad de células transfectadas que expresan opsinas sobre su superficie membranal (Kale *et al.*, 2015). Las opsinas son proteínas que tienen la capacidad de ser permeables a ciertos iones cuando la incidencia de luz a una longitud de onda en especial ocurre en ellas (Boyden, 2011; Deisseroth, 2011). De esta manera, la modulación mediante la estimulación fótica permite una modulación de alta resolución espacial y temporal (en ms) para sincronizar o desincronizar a neuronas u otros tipos celulares en diferentes tipos de tejido (Boyden *et al.*, 2005; Mattis *et al.*, 2012; Pama *et al.*, 2013). Debido a la capacidad de las diferentes opsinas para responder a la luz y a la variedad de ellas para la permeabilidad específica de iones (Deisseroth, 2011; Zhang *et al.*, 2011), la optogenética facilita la inhibición o excitación de las redes neuronales de una manera específica (Atasoy *et al.*, 2008; Boyden, 2011; Deisseroth, 2011). La expresión de estas opsinas puede darse mediante diversos mecanismos tales como la electroporación *in utero* (Petreanu *et al.*, 2007; Miyashita *et al.*, 2013) o la generación de ratones transgénicos (Arenkiel *et al.*, 2007; Zeng & Madisen, 2012). Otro método utilizando comúnmente, es la transfección de constructos virales que

contienen el gen de una opsina (Boyden, 2011). La infección viral para expresar opsinas se ha hecho mediante la utilización de vectores como los Lentivirus y los Virus Adeno-Asociados (AAV, por sus siglas en inglés) (Bernstein & Boyden, 2011; Han & Friedmann, 2012; Pama *et al.*, 2013; Adamantidis *et al.*, 2015; Chow & Boyden *et al.*, 2015). El vector lenti- o adeno-viral puede contener el gen de la opsina junto con un promotor que permitirá su expresión (Pama *et al.*, 2013; Cho & Li, 2016) o, de manera alterna, puede contener el gen de la opsina inicialmente presente en un marco inverso para prevenir su expresión, por ejemplo, flanqueado con los sitios *LoxP* (Zeng & Madisen, 2012; Cho & Li, 2016). De esta manera, se puede utilizar el sistema de la recombinasa Cre para permitir la expresión de la opsina (Rein & Deusing, 2012; Zeng & Madisen, 2012). En este sistema el gen de la opsina, al ser transfectado, requiere de la actividad recombinasa para la inversión de su secuencia codificante y la subsecuente expresión de la opsina (Rein & Deusing, 2012; Zeng & Madisen, 2012). La recombinasa Cre ha sido usada ampliamente para este objetivo, ya que se puede expresar de manera específica en tipos celulares particulares en animales transgénicos (Rein & Deusing, 2012; Zeng & Madisen, 2012).

1.3.2 Opsinas Microbianas y su uso en la optogenética

La opsina más conocida hasta el día de hoy es la Channelrhodopsina (ChR), cuya actividad ante la estimulación fótica modula la actividad de las neuronas (Boyden *et al.*, 2005). El Dr. Karl Deisseroth, pionero en este campo, acuñó el término de "Optogenética" en 2006 (Deisseroth, 2011). A partir de entonces, se generó interés en el desarrollo de esta técnica, con elementos tecnológicos que pudieran revolucionar el campo de las neurociencias en el contexto de la manipulación neuronal remota (Boyden, 2011). Además de la ChR, se demostró que hay una gran variedad de opsinas capaces de responder a la estimulación fótica en función de la longitud de onda presentada y las características intrínsecas de la proteína (Deisseroth, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Hacia el año 2010, el campo de la optogenética se tornó popular, y muchas herramientas surgieron para la activación o la inhibición de neuronas (Deisseroth, 2011) e incluso de otros tipos celulares

como los astrocitos (Gourine *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Sasaki *et al.*, 2012) y la microglía (Tanaka *et al.*, 2012; Sawada, 2012).

Las opsinas existen de manera natural en ciertos organismos, como las algas o las bacterias (Rein & Deussing, 2012; Pama *et al.*, 2013), en las que participan en la fototaxis (Spudich, 2006; Lin, 2011) y en la obtención de energía a partir de la captación de la luz (Mattis *et al.*, 2012; Samarendra & Lakshminarayanan, 2015). Además, también existen opsinas presentes en mamíferos que participan en el procesamiento de la visión (Zhang *et al.*, 2011). La primera opsina con potencial optogenético descrita fue una Bacteriorhodopsina (BR) aislada de una arqueobacteria llamada *Halobacterium halobium* (Oesterhelt & Strockenius, 1971). En este organismo, la BR le permite obtener energía a partir de luz, debido a un gradiente de protones que se forma cuando bombea protones fuera de la célula (Racker & Stoeckenius, 1974; Mattis *et al.*, 2012; Samarendra & Lakshminarayanan, 2015). Otro ejemplo de BR es la archaerhodopsina (Arch) perteneciente a *Halorubrum sodomense* (Rein & Deussing, 2012).

Tiempo después, se realizó el descubrimiento de las Halorhodopsinas (HR), las cuales se encuentran presentes también en archaeobacterias del género *Halobacterium* (Matsuno-Yagi y Mukohata, 1977; Samarendra & Lakshminarayanan, 2015). La HR es una bomba de cloro activada por luz, que permite a las halobacterias mantener una concentración alta de sal interna (Sasaki *et al.*, 1995; Mattis *et al.*, 2012; Samarendra & Lakshminarayanan, 2015). En el caso de la ChR, sus primeros estudios se realizaron mediante la obtención de la secuencia genómica del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Nagel *et al.*, 2002). Existen dos subclases de ChR que fueron identificadas por tres grupos de trabajo distintos (Nagel *et al.*, 2002, 2003; Sineshchekov *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2003): La Channelrhodopsina-1 (ChR1), inicialmente fue considerada como una opsina selectiva a protones (Nagel *et al.*, 2002), pero estudios posteriores descubrieron que tenía una amplia conductancia a cationes incluyendo Na⁺, K⁺ e incluso Ca²⁺ (Li *et al.*, 2009). La Channelrhodopsina-2, (ChR2), fue identificada en el mismo organismo (Nagel *et al.*, 2003) y es igual que la ChR1, un canal catiónico dependiente de la luz

(Nagel *et al.*, 2003). Sin embargo, el uso de la ChR2 se ha convertido en popular en comparación con la ChR1 ya que se expresa heterológicamente en mayores niveles en las células de mamíferos (Yizhar *et al.*, 2011).

Las opsinas fotosensibles aisladas de sistemas biológicos se clasifican de la siguiente manera (Yizhar *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Koyanagi & Terekita, 2013): Las opsinas de tipo I son las opsinas microbianas, mientras que las opsinas de tipo II son las opsinas animales (Zhang *et al.*, 2011; Pama *et al.*, 2013; Koyanagi & Terekita, 2013). Como ya se mencionó, las opsinas microbianas incluyen a las ChRs que se utilizan para activar a las neuronas (Deisseroth, 2011; Yizar *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011), mientras que las BRs y HRs se usan para inhibir o silenciar a las neuronas (Deisseroth, 2011; Chen *et al.*, 2012).

La función de las opsinas requiere de la capacidad de absorber fotones, lo que es conferido por un elemento conocido como *retinal* (Zhang *et al.*, 2011), que es un cofactor orgánico derivado de la vitamina A (Deisseroth, 2011). Las opsinas de mamíferos contienen dos elementos, el retinal y una proteína G acoplada (Yizhar *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). En el caso de las opsinas microbianas, el compuesto opsina-retinal se conoce como *rodopsina* (Boyden *et al.*, 2005) y tiene la capacidad de sensar la luz para posteriormente inducir el flujo de los iones en la misma proteína (Oesterhelt & Stoeckenius, 1974).

1.3.2.1 La Channelrhodopsina 2 (ChR-2)

La ChR2 es un canal iónico que se abre después de la absorción de un fotón y permite la permeabilidad para cationes monovalentes y divalentes (Nagel *et al.*, 2002). La ChR2 es una proteína de 7 hélices transmembranales que presenta un enlace covalente al retinal (cromóforo microbial all-trans-retinal, ATR) (Boyden *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011), por lo que es activable con una cinética rápida (en el orden de ms) mediante luz azul en el rango de 440-500 nm con un umbral de intensidad menor de 1mW/mm² (Samarendra & Lakshminarayanan, 2015).

Los 315 aminoácidos de la zona N-terminal de la ChR, son los encargados de la fotosensibilidad y son homólogos a la estructura de 7 hélices transmembranales de

muchas rodopsinas (Boyden *et al.*, 2005). Las corrientes entrantes observadas en las células que expresan ChR2 se evocan 50 μ s después de la presentación de la luz azul, en presencia del ATR, lo cual sugiere la posibilidad de la estimulación ultrarápida (Boyden *et al.*, 2005).

Las propiedades cinéticas de la ChR2 determinan las características de su fotociclo (Lin, 2010; Bamman *et al.*, 2010). Por ejemplo, la conductancia se encuentra por debajo de 1ps (Nagel *et al.*, 2003), que es menor a la conductancia de los canales membranales comunes (Lin, 2010). La selectividad iónica de la ChR2 se basa en una preferencia por Na⁺, K⁺, Ca²⁺, y H⁺ (Nagel *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008), por lo que tienen un potencial de inversión cercano a 0 mV a pH fisiológico (Lin, 2010). Existe mucha variación en cuanto a la sensibilidad a la luz en las diversas ChR (Lin *et al.*, 2009) y, actualmente, hay mutaciones en las ChR que aumentan dicha variable (Lin, 2010). Finalmente, con respecto del tráfico membranal y la expresión de las ChR, puede decirse que una sobreexpresión de estas proteínas exógenas, por periodos prolongados, puede inducir toxicidad y/o efectos adversos en las propiedades membranales (Lin, 2010). En cambio, la expresión baja y/o la formación de agregados intracelulares de las ChR2 reducen la eficiencia de la despolarización membranal (Lin, 2010).

1.3.3 Modulación optogenética de los circuitos neuronales

En nuestro laboratorio se han realizado estudios relacionados con el control de los circuitos neuronales mediante la activación optogenética de interneuronas y otros tipos celulares (Vargas 2014; Rojas, 2015). El primer estudio fue realizado para manipular de manera específica a la población de interneuronas GABAérgicas hipocampales. Este proyecto implicó el uso del sistema de la recombinasa Cre para expresar a la ChR2 en ratones transgénicos que expresaban la enzima Cre en interneuronas (TR-CRE/GAD65) de manera específica (Vargas 2014). Los resultados mostraron que la estimulación fótica con diferentes trenes de estimulación, a distinta frecuencia, indujo la generación de ritmos theta en el circuito

hipocampal debido a la activación de las interneuronas (Vargas, 2014). Comparativamente, se evaluó el efecto de la estimulación farmacológica de las interneuronas, con lo cual se mostró que la administración de Neuregulina, cuyo receptor ErbB4 se expresa de manera específica en las interneuronas (Ozaki *et al.*, 1998). La activación farmacológica de este receptor no genera ritmos theta, posiblemente por no presentar una adecuada resolución temporal, comparada con la estimulación fónica (Vargas, 2014).

De la misma manera, en nuestro laboratorio realizamos, recientemente, la caracterización de los efectos de la activación optogenética sobre la actividad espontánea de rebanadas del BO obtenidas a partir de ratas que fueron transfectadas con un vector viral que indujo la expresión de la ChR2 sin el control de un promotor que dirigiera la especificidad de la expresión a algún tipo celular (Rojas, 2015). Nuestros resultados revelaron que ante la estimulación fónica el BO, este circuito oscila en un rango de frecuencias bajas, independientemente de la frecuencia de estimulación fónica. Estos datos sugieren que la estimulación optogenética modula la actividad del BO para generar actividad poblacional en un rango muy restringido de frecuencia, posiblemente debido a las propiedades de resonancia de este circuito neuronal (Rojas, 2015).

A pesar de que el área de estudio de la circuitería del BO mediante el uso de la optogenética no es muy vasta, se han reportado recientemente trabajos relacionados con la modulación de interneuronas y neuronas principales en esta área cerebral (Bardy *et al.*, 2010; Valley *et al.*, 2013; Lepousez & Lledo, 2013; Li *et al.*, 2014; Fukunaga *et al.*, 2014; Gschwend *et al.*, 2015). Por ejemplo, en uno de los primeros trabajos de optogenética en el BO, se evaluó la temporalidad y la funcionalidad inhibitoria de las interneuronas nuevas en el cerebro adulto, mediante la expresión de la ChR2 en neuroblastos provenientes de la corriente migratoria rostral (Bardy *et al.*, 2010). De esta manera, se logró monitorear y manipular la actividad eléctrica de estas células nuevas después de su incorporación en el BO (Bardy *et al.*, 2010). Esta manipulación de interneuronas permitió revelar una diversidad de blancos sinápticos de las interneuronas nuevas, como células

granulares maduras, células juxtaglomerulares y células de proyección (Bardy *et al.*, 2010). Los estudios de control optogenético sobre la caracterización del papel de las interneuronas, en especial de las granulares, han sido los más recurrentes, dada la importancia de estos tipos celulares en la configuración de las redes neurales olfatorias (Valley *et al.*, 2013; Lepousez & Lledo, 2013; Fukunaga *et al.*, 2014). Mediante estos estudios, se ha descubierto que las interneuronas están implicadas en la sincronización de las células granulares con las células de proyección (Valley *et al.*, 2013; Lepousez & Lledo, 2013) y que esta dinámica incide en la orquestación diferencial de los ritmos bulbares (Fukunaga *et al.*, 2014). Tras la activación optogenética se pudo dilucidar que las interneuronas granulares son capaces de generar el ritmo rápido gamma a través de su sincronización con las células de proyección (Lepousez & Lledo, 2013). Por otra parte, el silenciamiento optogenético de las interneuronas granulares pudo confirmar este dato y, adicionalmente, se pudo conocer que hay poblaciones distintas de interneuronas que se encargan de la generación del ritmo gamma (a través de las células granulares) y del ritmo theta (a través de las células glomerulares) (Fukunaga *et al.*, 2014). También se ha demostrado, gracias a la optogenética, que el ritmo gamma generado por esta sincronización entre interneuronas granulares y las células de proyección modula la discriminación olfatoria mediada por el refinamiento de los patrones neuronales de la entrada sensorial (Gschwend *et al.*, 2015)

Estos estudios realizados en los últimos años, así como los antecedentes de nuestro laboratorio obtenidos mediante la técnica optogenética, nos permiten sugerir que es posible la activación de circuitos neuronales diversos, para dilucidar cómo un tipo celular en especial, es capaz de modular la funcionalidad del BO (Rojas, 2015).

1.3.4 Control optogenético de las células gliales

Aunque la optogenética fue aplicada originalmente en distintos tipos neuronales para manipular la actividad eléctrica de los circuitos (Deisseroth, 2011), las aproximaciones experimentales de esta técnica son muy versátiles, por lo cual son ampliamente aplicables para otros tipos de células y sistemas biológicos (Yawo *et al.*, 2013). Por ejemplo, las células de la glía son consideradas ahora blanco potencial para la manipulación optogenética (Figueiredo *et al.*, 2011; Yawo *et al.*, 2013; Masamoto *et al.*, 2015). En este sentido, la estimulación optogenética puede inducir un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico en astrocitos del tallo cerebral (Figura 6) (Gourine *et al.*, 2010). Estos astrocitos pertenecientes a áreas quimiorreceptoras del núcleo retrotrapezoide, responden de manera fisiológica a decrementos del pH con elevaciones en el Ca^{2+} intracelular, lo que lleva a la liberación de ATP (Gourine *et al.*, 2010). Esta liberación de ATP a su vez propaga la excitación astrocítica inducida por el incremento en el Ca^{2+} , lo que deriva en la liberación de gliotransmisores y activa a las neuronas quimiorreceptoras que, a su vez, provocan un incremento adaptativo en la respiración (Gourine *et al.*, 2010). La simulación de las respuestas de Ca^{2+} inducidas por pH mediante la estimulación optogenética de estos astrocitos es capaz de activar a las neuronas quimiorreceptoras mediante un mecanismo dependiente de ATP, lo que desencadena respuestas respiratorias robustas *in vivo* (Gourine *et al.*, 2010). De manera similar, se ha reportado que el incremento en el Ca^{2+} citosólico mediante la estimulación con 470 nm de longitud de onda en astrocitos que expresan la ChR2 puede inducir la liberación de glutamato vía canales aniónicos (Li *et al.*, 2012). Asimismo, la liberación de glutamato inducida por la estimulación fótica también ha sido reportada para la glía Bergmann en el cerebelo, lo que además es capaz de provocar la activación de receptores de tipo AMPA en células de Purkinje y la depresión de largo plazo de las sinapsis entre las células de Purkinje y las fibras paralelas mediante la activación de receptores metabotrópicos de glutamato (Sasaki *et al.*, 2012).

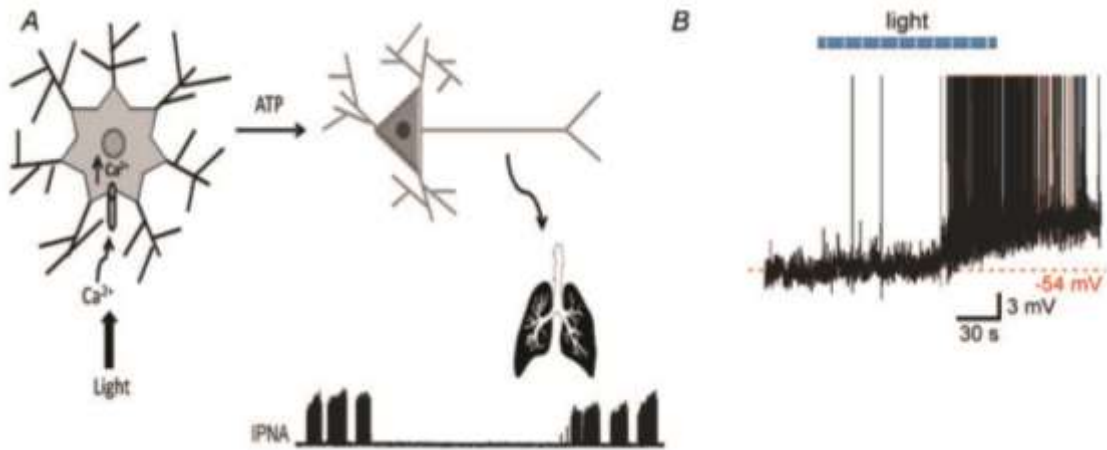


Figura 6.- Activación optogenética en la glía. La fotoestimulación de astrocitos que expresan ChR2 induce el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y, por consiguiente, la liberación de gliotransmisores (p.e. ATP). Los astrocitos estimulados optogenéticamente inducen excitación de las neuronas del núcleo retrotrapezoide (RTN, por sus siglas en inglés) y, finalmente, se produce un incremento robusto en la actividad respiratoria. IPNA: Actividad integrada del nervio frénico (por sus siglas en inglés). Tomado de Gourine *et al.* 2010.

A pesar de que las células de la microglía no se comunican de manera eléctrica con las neuronas, y de que han sido categorizadas tradicionalmente como no excitables, existen trabajos pioneros que la manipulan optogenéticamente (Tanaka *et al.*, 2012; Sawada, 2012; Yawo *et al.*, 2013). Sin embargo, los mecanismos por los cuales la microglía es capaz de activarse debido al efecto de la luz a 450 nm, aún no son bien conocidos (Cheng *et al.*, 2016). El reto del uso de la optogenética para la manipulación en la microglía ha comenzado a enfrentarse en trabajos muy recientes (Tanaka *et al.*, 2012; Swada, 2012; Chang *et al.*, 2016). Por ejemplo, en un estudio publicado por Tanaka y colaboradores en 2012, se indujo un modelo particular de expresión génica de la ChR-2 alternativo al modelo de expresión ya conocido Cre/loxP, que se trata del sistema tTA-tetO (promotor dependiente de tTA o activador transcripcional dependiente de tetraciclina) que tiene la ventaja de poder regular la expresión génica temporalmente mediante la aplicación de la doxiciclina. Usando este sistema, una variante de la ChR-2 altamente sensible a la luz fue expresada selectivamente en diversos tipos celulares, incluyendo células gliales como astrocitos y microglía. Los resultados de este estudio mostraron que la microglía en la corteza presentó corrientes inducidas por luz mediante esta técnica

(Tanaka *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha reportado que la modulación optogenética es capaz de controlar la activación microglial al producir un incremento en la expresión de genes de citoquinas pro-inflamatorias y de la sintasa de óxido nítrico (Swada, 2012). De manera muy interesante, también se ha reportado que la estimulación con luz azul de baja intensidad y frecuencia sin la presencia de una opsina fotosensible, induce un efecto contrario en preparaciones *in vitro*, es decir, se observa una reducción en la expresión basal de genes de factores neurotróficos e inflamatorios en cultivos microgliales (Chang *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren implicaciones nuevas e importantes para el campo optogenético y enfatizan la necesidad de estudios futuros para dilucidar los mecanismos moleculares que intervienen en la modulación de la actividad microglial ante la presencia de luz azul en función de los parámetros de estimulación fótica y la modalidad de la preparación experimental.

1.4 Activación microglial farmacológica

Las aproximaciones experimentales más comunes para estudiar el efecto de la activación de la microglía incluyen la activación de los receptores de tipo Toll (Kawai & Akira, 2010). Como se mencionó anteriormente, dentro de una gran variedad de receptores, la microglía expresa un conjunto de receptores tipo Toll conocidos como la familia de los TLRs (Olson and Miller, 2004). Los TLRs son una clase de proteínas que inician respuestas inmunes innatas mediante el reconocimiento de patrones asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), los cuales están presentes normalmente en patógenos como bacterias Gram (-) y Gram (+) (Akira *et al.*, 2006). Por ejemplo, el receptor TLR4 es usado ampliamente como blanco experimental para la activación de la microglía; numerosos trabajos han utilizado esta aproximación experimental mediante el uso del lipopolisacárido (LPS, por sus siglas en inglés) (Wang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012; Lorea-Hernández *et al.*, 2016) un PAMP descrito como el componente principal de la pared celular de las bacterias

Gram (-) que posee un gran potencial inmunogénico y que incide en la liberación de citocinas (Yoon *et al.*, 2012).

El receptor TLR2 tiene un papel importante en la activación de la microglía (Kawai & Akira, 2010). Por ejemplo, se ha demostrado que este receptor es necesario para la activación de la microglía en la médula espinal, como resultado de un daño periférico; así como durante procesos de muerte celular producto de citotoxicidad (Hayward & Lee, 2014). Este receptor es también importante para la activación de la microglía en otras estructuras del cerebro bajo condiciones de isquemia (Lalancette-Hebert *et al.*, 2009;). El TLR2 se encuentra normalmente formando heterodímeros con TLR1 o TLR6, lo cual resulta en una alta especificidad de ligando (Oosenbrug *et al.*, 2017; Kawai & Akira, 2010). El heterodímero TLR1-TLR6 es capaz de reconocer lipopéptidos triacetilados presentes en bacterias Gram (-), mientras que el heterodímero TLR2-TLR6 es capaz de reconocer lipopéptidos diacetilados provenientes de bacterias Gram-positivas (Kawai & Akira, 2010). Sobre esta base, el PAM-FAM es un fármaco que fue creado sintéticamente para combinar el lipopéptido diacetilado Pam2CSK4 con un fluoróforo llamado 5/6 carboxifluoresceína (Mancini *et al.* 2011). El PAM-FAM y el conocido MALP-2 son ejemplos de agonistas sintéticos (tipo lipopéptido) del complejo receptor TLR2/TLR6 (Wang *et al.*, 2013). El mecanismo de acción del PAM-FAM es interesante, ya que este compuesto puede asociarse con los receptores TLR2 sin provocar la dimerización TLR2/6 y la consecuente señal de transducción (Mancini *et al.* 2011). Sin embargo, después de la radiación con luz ultravioleta, un grupo molecular fotolábil es liberado, permitiendo la interacción del TLR2 con el TLR6, lo que permite la activación del complejo TLR2/6 que finalmente resulta en la transcripción de genes de citocinas pro-inflamatorias como el TNF α , la IL-1 β , la IL-6, la IL-8, la CXCL1 y los interferones tipo I alfa y beta (IFN- α y IFN- β) (Medzhitov, 2001; Tseng *et al.*, 2010; Mancini *et al.* 2011).

2. Justificación

Se ha comprobado que la microglía puede tener diversas funciones fisiológicas en el tejido nervioso, y que una de ellas es la modulación de la actividad eléctrica de las neuronas; en este proyecto pretendemos utilizar la estimulación optogenética de este tipo celular para entender su influencia en la conducta olfatoria y la actividad neuronal del BO. Como una manera alternativa de activación microglial, también nos planteamos comparar el efecto de la activación optogenética con la activación farmacológica mediante la activación del PAM-FAM con luz ultravioleta, el cual es un agonista sintético del complejo receptor TLR2/6 (un tipo de receptor que pertenece a la familia de receptores de tipo Toll, la cual es usada ampliamente como estrategia experimental para estudiar el efecto de la activación de la microglía en el SNC).

3. Hipótesis

La estimulación fotónica de la microglía modulará la actividad neuronal poblacional en el BO.

4. Objetivo General

Caracterizar los efectos de la estimulación fotónica sobre la microglía y su incidencia en la actividad poblacional del BO en preparaciones *in vivo*.

4.1. Objetivos Particulares

1. Caracterizar el efecto de la activación optogenética de la microglía sobre la actividad poblacional del BO *in vivo*.
2. Comparar los efectos de la activación optogenética microglial con la activación desencadenada por un agonista-fotosensible de los receptores tipo *Toll-2* en la microglía.
3. Caracterizar el efecto de la activación optogenética microglial en la conducta olfatoria.

5. Sujetos, Materiales y Métodos

5.1 Animales

Se empleó una línea de ratones transgénicos hembras de 8 semanas de edad (19-24 gr) de la cepa CX3CR1-Cre (JAX stock #025524: *B6J.B6N (Cg)-Cx3cr1^{tm1.1 (cre)Jung/J}*) criados en la *unidad de animales transgénicos* del Instituto de Neurobiología, los cuales expresaron la enzima recombinasa Cre en células microgliales dada su expresión regulada por el promotor del gen que codifica para el receptor exclusivo de la microglía CX3CR1 (receptor de fractalquina tipo 1; Parkhurst *et al.*, 2013). Esta línea de animales fue designada para el registro de campo *in vivo*, la obtención de rebanadas para la estandarización del tiempo de estimulación con la ayuda de microscopia de fluorescencia, y la inmunohistoquímica. Para estos procedimientos, los sujetos fueron previamente transfectados con un vector adenoviral que contenía la secuencia genética de la opsina microbiana ChR2 flanqueada con dos secuencias LoxP (AAV2/1.EF1a.DIO.hChR2(H134R)-EYFP.WPRE.hGH), creado por *Penn Vector Core* (Addgene 20298). La inducción de la expresión de la ChR2 fue dirigida por la actividad de la recombinasa Cre, ya que cuando esta enzima se expresa, en este caso de manera exclusiva en la microglía en la línea de ratones transgénicos CX3CR1-Cre, presenta un mecanismo de corte en los sitios LoxP que flanquean el gen de la ChR2 para realizar la transcripción de la secuencia del gen (Vargas, 2014); estos animales fueron posteriormente utilizados para el registro de la actividad eléctrica de campo en el BO tres semanas post-transfección (11 semanas de edad). De manera paralela, dos grupos de esta misma línea de animales fueron designados como controles para la transfección con el vector viral que indujo la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés): LV/SFFV-TER-eGFP-WPRE, producido en la *unidad de proteogenómica* del Instituto de Neurobiología, UNAM, con base en el protocolo de la *administración*

central viral del Instituto Salk (Moreno-Carranza, 2009). También se utilizaron los mismos animales en ausencia de la transfección con el vector viral que lleva la secuencia de la ChR2.

Por otra parte, para la realización de la prueba conductual olfatoria se utilizaron ratones de 11 semanas de edad que expresaron ChR2 exclusivamente en la microglía; esta línea de ratones fue obtenida a partir de la cruce de los ratones transgénicos “CX3CR1-Cre” (JAX stock #025524) con ratones “Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE” (JAX stock #012569), los cuales fueron criados en la *unidad de transgénicos* del Instituto de Neurobiología. Paralelamente, un grupo de ratones de esta misma línea fue designado para la obtención de rebanadas necesarias para la verificación de la expresión de la ChR2 mediante fluorescencia e inmunohistoquímica.

Adicionalmente, se utilizó un grupo de ratones hembrade la cepa silvestre C57BL/6 de 11 semanas de edad designados para el registro *in vivo* y que fueron inoculados con el péptido PAM-FAM, así como su grupo control.

Todos los animales fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, en un cuarto a una temperatura de 22 °C con un ciclo normal de 12 horas luz: 12 horas oscuridad y alimentación *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo siguiendo las normas del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura (SAGARPA NOM-062-ZOO-1999).

5.2 Microinyección de los vectores adenovirales

Para realizar la transfección de los vectores virales que indujeron la expresión de la ChR2-EYFP y la GFP, los animales de ambos grupos fueron anestesiados con xilazina (5 mg/kg) y ketamina (100 mg/kg) i.p. Posteriormente, fueron colocados en el aparato estereotáxico de ratón (Stoelting Co., IL), según el procedimiento descrito en la guía de Cooley y Vanderwolf (1990). Las coordenadas de inyección usadas

para este procedimiento fueron AP: 4.8 a partir Bregma, ML: ± 0.7 a partir de la línea media, y DV: -1.7 a partir de la duramadre, obtenidas mediante la referencia de coordenadas del atlas de Paxinos y Franklin (Paxinos & Franklin, 2001). Después de la ubicación de estas coordenadas, se realizaron dos trépanos con el uso de una turbina recta rotatoria (Gacela Omega) y por cada BO se insertó una cánula de inyección mediante la cual se inocularon 0.7 μl (concentración: 10^{13}GC/ml) del vector viral AAV2/1.EF1a.DIO.hChr2(H134R)-EYFP.WPRE.hGH (Addgene20298) que indujo la expresión de la Chr2, a una velocidad de 0.1 $\mu\text{l/min}$, permitiendo la difusión de este contenido durante 5 minutos extra al finalizar la inyección. Posteriormente, la cánula se ascendió lentamente y el cráneo fue sellado con acrílico dental (MDC Dental-NicTone R3V) para finalmente dejar a los animales en una incubadora e inducir su recuperación. Este mismo procedimiento se realizó para la inyección del vector viral LV/SFFV-TER-eGFP-WPRE que indujo la expresión de la GFP. En todos los casos de expresión viral inducida, el proceso de infección y expresión génica se dejó transcurrir por tres semanas.

5.3 Verificación de la expresión de la Chr2 y la GFP mediante imágenes de fluorescencia

Se tomaron micrografías de fluorescencia de las rebanadas obtenidas de los animales transgénicos de la cruce de los ratones transgénicos “CX3CR1-Cre” con ratones “Rosa-CAG-LSL-Chr2 (H134R)-EYFP-WPRE” así como de aquellos animales “CX3CR1-Cre” que fueron transfectados con los vectores virales para expresar GFP y Chr2 mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600FN; software RSIimage 1.9.2) así como de un microscopio de luz de alta definición (Zeiss Axioimager M.2; software Zen 2.3 blue Edition). Como un procedimiento de estandarización del tiempo requerido para la estimulación fótica del tejido microglial, se tomaron micrografías de fluorescencia de rebanadas obtenidas de animales transfectados con el vector viral para expresar Chr2. Dichas imágenes se analizaron mediante el software Image J1.48v. El procedimiento

incluyó la verificación de la expresión de la ChR2 en las rebanadas obtenidas antes y después de la estimulación (5, 10, 15, 20 min de exposición de luz continua) para observar la morfología de la microglía según sus estados: activo (microglía ramificada) e inactivo (microglía ameboide). La expresión de la ChR2, codificada junto con la proteína amarilla fluorescente potenciada (EYFP, por sus siglas en inglés) como reportero, pudo ser visualizada mediante el uso de un filtro de excitación pasa banda de 500 nm con una anchura de 20 nm (pico de excitación para la EYFP: 514 nm; pico de emisión de la EYFP: 527 nm) (Franco & Longart, 2009). En el caso de las rebanadas que expresaron a la GFP, la marca fluorescente fue visualizada mediante un filtro de excitación pasa banda de 470 con una anchura de 40 nm BP (pico de excitación de la GFP: 488 nm; pico de emisión de la GFP: 503 nm) (Franco & Longart, 2009; Telford *et al.*, 2015).

5.4 Protocolo de inmunohistoquímica para la verificación de la expresión de la ChR2 de manera específica en la microglía

Para verificar que la marca fluorescente que indica la expresión de la ChR2 correspondiera a las células microgliales, se realizó simultáneamente el protocolo de inmunohistoquímica para identificar a la proteína Iba-1. El anticuerpo secundario utilizado en este protocolo estaba unido al fluoróforo Alexa 568. Para llevar a cabo este marcaje, se cortaron rebanadas de 40 μm de grosor del BO de animales transgénicos CX3CR1-Cre, previamente transfectados con el vector viral que indujo la expresión de la ChR2 y animales CX3CR1-Cre/Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE. Después del protocolo de inmunohistoquímica, se hizo la captura simultánea de imágenes para observar la fluorescencia de la marca EYFP, la cual indica la presencia de la ChR2; así como del Alexa 568, la cual indica la presencia de la microglía. Para la obtención del tejido se requirió previamente de la anestesia y el montaje estereotáxico de los sujetos transfectados o transgénicos que expresan la ChR2, los cuales se sometieron a la estimulación *in vivo* con 20 min de luz azul continua sobre ambos BO's (después de un procedimiento de cráneo rebajado), así como de animales no estimulados como control. Posteriormente, se llevó a cabo la

perfusión transcardiaca con el fijador tisular paraformaldehído (PFA) al 4%, dos horas después de la estimulación con luz azul, en el caso de los animales estimulados, e inmediatamente después del procedimiento de cráneo rebajado en el caso de los sujetos no estimulados. La perfusión transcardiaca permitió la extracción del cerebro completo como primer paso del procedimiento de histología. Dos días después de la incubación del tejido en PFA 4%, el tejido se dejó reposar en PBS 0.1 M durante un día para proceder al corte de rebanadas en un vibratomo. Se realizó el corte de rebanadas de 40 μ m de grosor en un vibratomo (Vibratomo de la Unidad de microscopía Leica VT1200). Las rebanadas obtenidas se guardaron en una solución de Azida de Sodio + PBS 0.1M, como solución antifúngica, para su mantenimiento.

El protocolo de inmunohistoquímica consistió brevemente en el lavado repetido de 4 rebanadas con PBS 0.1 M y la aplicación de una solución de bloqueo que contenía 3% de suero normal de burro (NDS, por sus siglas en inglés) + 0.3% tritón X-100 en 0.1 M PBS) durante una hora. Posterior a ello, se realizó la aplicación de una solución de anticuerpo primario Iba-1 (Anti Iba1, Rabbit; catálogo *Wako* No. 019-19741) (1:1000) preparado en 1% de NDS + 0.1% de tritón X-100 en PBS 0.1 M y la incubación del tejido en esta solución a 4° C durante una noche. Al día siguiente, las rebanadas fueron lavadas nuevamente en PBS 0.1 M y se aplicó el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 568, Donkey Anti-Rabbit igG; *life technologies* A10042) (1: 500), preparado en 1% NDS + 0.1% tritón X-100 en PBS 0.1 M) durante 2 horas. El tejido fue lavado nuevamente y se realizó la aplicación de una solución que contenía DAPI (1: 40,000) preparada en 0.1 M PBS. Después de esto, las rebanadas fueron lavadas y montadas sobre portaobjetos, en los cuales se dejaron secar al aire para finalmente ser deshidratadas y blanqueadas a través de gradientes de alcohol al 70%, 95%, 100% y xileno (dos veces) durante 2 minutos cada una. Finalmente, las rebanadas fueron cubiertas con resina de montaje DPX y un cubreobjetos; las laminillas obtenidas se dejaron reposar a 4°C protegidas de la luz con papel aluminio y al determinar que la resina estaba seca fue posible usarlas para su observación en el microscopio de epifluorescencia antes descrito.

5.5 Protocolos de Genotipificación de los animales transgénicos

5.5.1 CX3CR1-Cre

Para la genotipificación de los animales transgénicos CX3CR1-Cre (JAX stock #025524: *B6J.B6N (Cg)-Cx3cr^{1tm1.1 (cre)Jung/J}*), (Yona *et al.*, 2013) se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Oligo # (catálogo Jax Lab)	Longitud	Dirección de amplificación	Secuencia
20669	20	Silvestre de avance	AGC TCA CGA CTG CCT TCT TC
20670	20	Común	GCA GGG AAA TCT GAT GCA AG
21250	19	Mutante de avance	GAC ATT TGC CTT GCT GGA C

Tabla 1. Oligonucleótidos que se usan para la genotipificación de los animales transgénicos CX3CR1-Cre

5.5.1.1 Extracción de ADN

Para realizar la extracción del ADN, se cortó un pedazo de la cola o de la oreja de los ratones adultos de 11 semanas de edad. El pedazo de tejido se colocó en un tubo de 1.5 ml de volumen y se adicionaron 500 µl de NaOH 0.05M, posteriormente se incubaron a 95 °C por 15 minutos. Finalmente se agregaron 50 µl de la solución stop (1M TRIS y 10mM EDTA) para dar paso a la reacción de PCR.

5.5.1.2 Reacción de PCR

Se colocaron 5 µl de ADN de cada una de las muestras en el Master Mix de PCR (que contenía: 2.4 µl de buffer, 0.96 µl de MgCl₂, 0.24 µl de dNTPs, 4.85 µl de H₂O libre de RNAsas, 0.3 µl de primer 20669, 0.3 µl de primer 20670, 0.3 µl de primer 21250, 0.05 µl de Taq polimerasa *Invitrogen*) y se colocaron en el Termociclador. Los tubos de reacción fueron sometidos a diferentes ciclos con cambios repetidos de temperatura en diferentes pasos necesarios para llevar a cabo las etapas de amplificación de los oligonucleótidos molde: a) 94°C durante 2 min; b) 15 ciclos

repetidos que consistieron en 20 s a 94 °C, 15 s a 65 °C (disminuyendo 0.5 °C por ciclo), 10 s a 68 °C; c) 35 ciclos que consistieron en 15 s a 94 °C, 15 s a (55 °C, 57 °C y 59 °C), 10 s a 72 °C; 2 min a 72 °C y d) un mantenimiento final a 10 °C.

5.5.1.3 Gel de agarosa al 1.6 %

Se preparó un gel de agarosa (que contenía: 0.48 gr de Agarosa y 30 ml de TBE) donde se cargaron 5 µl del marcador del peso molecular y 3 µl de colorante con 10 µl de PCR para cada prueba. Se corrió el gel a 80 V durante 20 minutos.

5.5.2 CX3CR1-Cre/Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE

Para la genotipificación de los animales transgénicos de la línea obtenida a partir de la cruce de los ratones CX3CR1-Cre con los ratones Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE, se utilizó el protocolo de genotipificación anteriormente descrito y se realizó de manera paralela el protocolo correspondiente a los animales Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE (JAX stock #012569: *B6;129S-Gt(ROSA)26Sor^{tm32(CAG-COP4*H134R/EYFP)Hze/J}*), con el fin de verificar que los animales cruzados fueran heterocigotos para ambos genes. Los oligonucleótidos utilizados para esta genotipificación fueron los descritos parcialmente antes (tabla 1) y de manera paralela aquellos oligonucleótidos requeridos para la genotipificación de los ratones Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE que se muestran en la siguiente tabla (Madison *et al.*; 2012):

Oligo # (catálogo Jax Lab)	Dirección de amplificación	Secuencia	Nota
oIMR9020	Silvestre de avance	AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA	
oIMR9021	Silvestre reverso	CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC	
oIMR9102	Mutante de avance	ACA TGG TCC TGC TGG AGT TC	YFP/EGFP
oIMR9103	Mutante Reverso	GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC	WPRE

Tabla 2. Oligonucleótidos que se usan para la genotipificación de los animales transgénicos Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE.

5.5.2.1 Reacción de PCR

La extracción del tejido fue realizada de la misma manera que aquella descrita para los animales CX3CR1-Cre.

Posteriormente, se colocaron 200 ng de ADN de cada una de las muestras en el Master Mix de PCR (que contenía: 1.3 µl de buffer, 2.6 µM de MgCl₂, 0.26 mM de dNTPs, 5 µl de H₂O libre de RNAsas, 0.5 µM de primer oIMR9020, 0.5 µM de primer oIMR9021, 0.5 µM de primer oIMR9102, 0.5 µM de primer oIMR9103, glicerol al 6.5% y 0.03 U/µl de Taq polimerasa *Invitrogen*) y se colocaron en el Termociclador. Los tubos de reacción fueron sometidos a diferentes ciclos con cambios repetidos de temperatura de manera idéntica a la anteriormente descrita. Finalmente se prepararon los geles de agarosa al 1.6% en las mismas condiciones del protocolo de genotificación anterior y se cargaron las escaleras moleculares correspondientes al CX3CRL-Cre y al Rosa CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE) en geles distintos.

5.6 Experimentos *In Vivo*

5.6.1 Craneotomía, Protocolo de Registro Electrofisiológico de Campo y estimulación fótica

5.6.1.1 Grupo experimental-activación microglial mediante la activación de la ChR2

La experimentación *in vivo* se realizó en presencia de luz roja para evitar la excitación de la ChR2. Los sujetos fueron sometidos a una cirugía estereotáxica a partir de los 20-24 días de la transfección del vector viral que indujo la expresión de la ChR2. Los animales fueron anestesiados con uretano (1 g/kg i.p.) y colocados en el aparato estereotáxico de ratón (Stoelting Co., IL), según el procedimiento descrito en la guía de Cooley y Vanderwoolf (1990). Se realizó un procedimiento de cráneo rebajado en una ventana craneal de 3 x 3 mm sobre ambos BOs, de manera tal que la duramadre permaneciera intacta excepto en la zona en donde fue implantado un electrodo de borosilicato, con una resistencia de 1-2 M Ω y lleno de líquido cefaloraquídeo artificial (LCRA) que contenía (en mM): 119 NaCl, 30 glucosa, 25 NaHCO₃, 3 KCl, 1 MgCl₂ y 1.5 CaCl₂ y pH (7.4). El electrodo fue ubicado en las siguientes coordenadas: AP: 4.7 a partir bregma, ML: \pm 0.7 a partir de la línea media, y DV: -1.6 a partir de la duramadre (Paxinos & Franklin, 2001).

El protocolo de registro electrofisiológico y estimulación fótica, se llevó a cabo como sigue: se registraron 15 min de actividad basal y, posterior a ello, se realizó una estimulación sensorial con dos odorantes de manera independiente como se ha descrito por Hernández-Soto (2015) en nuestro laboratorio. La primera estimulación sensorial consistió en la exposición a 15 μ l de acetato de amilo (1% en aceite mineral) impregnado un hisopo de algodón que se colocó directamente enfrente de las narinas del ratón durante de 10 s. Después de 3 min de recuperación de la señal, se realizó el segundo estímulo con esencia de limón natural (Droguería Cosmopolita S.A DE C.V), de manera idéntica al estímulo anterior. Después de registrar el efecto de la estimulación sensorial de manera basal, se realizó la estimulación con luz azul continua mediante el uso de un LED con una emisión a

460 nm y una potencia de 17 mW/mm² a una distancia de 0.5 cm del cráneo. Inmediatamente después de que la luz fue retirada, se realizó el protocolo de estimulación sensorial con acetato de amilo y esencia de limón ya descrito; el cual fue repetido a los 30 min y 60 min posteriores a la exposición a la luz azul para evaluar el efecto de la estimulación fótica sobre la respuesta del BO inducida por olores. Concluido el registro, el ratón fue eutanizado con una sobredosis de pentobarbital sódico. Fig. 7. La señal electrofisiológica registrada fue amplificada, filtrada en un rango de 1.5-3000 Hz y digitalizada a 3 kHz. Finalmente, el registro fue almacenado en una computadora para su análisis fuera de línea.

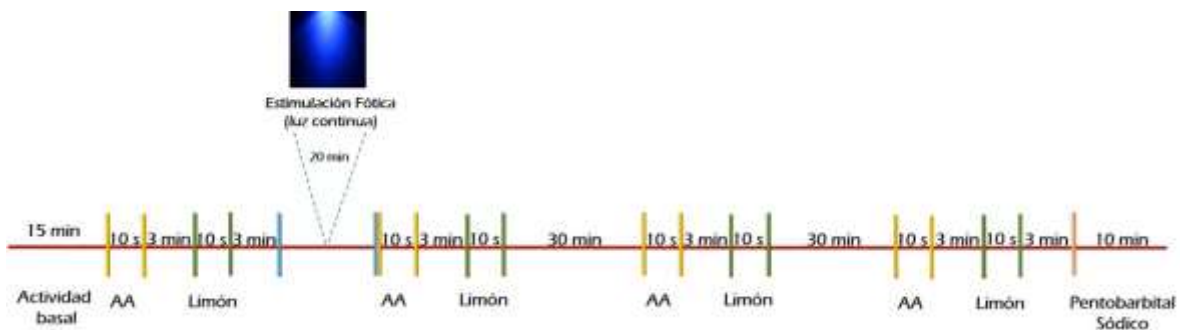


Figura 7.- Protocolo de estimulación sensorial y fótica con luz azul durante el registro de la actividad electrofisiológica *in vivo*. El esquema muestra los diferentes tiempos en los que se realizaron registros de la actividad electrofisiológica del animal anestesiado: 15 min. de actividad basal previa a la luz; 10 segundos de estimulación olfatoria mediante la presentación de un hisopo con acetato de amilo (amarillo) y esencia de limón natural (verde); la estimulación durante 20 min. con luz azul continua; la estimulación olfatoria a los 30 y 60 min posteriores a la presentación de la luz y la eutanización del animal con una sobredosis de pentobarbital sódico.

5.6.1.2 Grupos control: GFP y ChR2 (-)

Se llevó a cabo el registro electrofisiológico de campo *in vivo* en los animales previamente transfectados con el vector viral LV/SFFV-TER-eGFP-WPRE que indujo la expresión de la GFP. Se llevó a cabo el procedimiento de foto-estimulación *in vivo* descrito anteriormente (Fig. 7). La señal electrofisiológica registrada fue amplificada, filtrada en un rango de 1.5-3000 Hz y digitalizada a 3 kHz. Finalmente, el registro fue almacenado en una computadora para su análisis fuera de línea.

5.6.1.3 Grupo experimental-activación microglial mediante la estimulación del compuesto fotosensible PAM-FAM

Con el fin de evaluar la activación de la microglía de una manera alternativa a la modulación optogenética, se realizó un protocolo de activación mediado por un agonista foto-activable de los receptores de tipo *Toll-2* (TLR-2): el lipopéptido Pam2CSK4 (PAM) (agonista de TLR2/6) unido al fluoróforo FAM (5/6 Carboxifluoresceína) (Mancini *et al.*, 2011). El protocolo se llevó a cabo como sigue: se realizó el procedimiento de cirugía estereotáxica y la inyección en la capa granular de BO (AP: 4.8 a partir bregma, ML: \pm 0.7 a partir de la línea media, y DV: - 1.7 a partir de la dura) de ratones C57BL/6 de 11 semanas de edad con un volumen de 1.0 μ l del fármaco (10 ng/ml) a una velocidad de 0.1 μ l/min. Se dejó el animal en una incubadora durante tres horas para permitir la unión del fármaco en el tejido. Posteriormente, se realizó un procedimiento de cráneo rebajado y el registro de campo electrofisiológico (AP: 4.7 a partir bregma, ML: \pm 0.7 a partir de la línea media, y DV: - 1.7 a partir de la dura) y el protocolo de estimulación sensorial y fótica de manera idéntica a la descrita para la ChR2, pero sustituyendo la luz azul con luz ultravioleta continua durante 10 min en cada exposición, la cual fue irradiada mediante un filtro de luz ultravioleta (360-380 nm; SFA-LSF-UV Nightsea). Fig. 8. La señal electrofisiológica registrada fue amplificada, filtrada en un rango de 1.5-3000 Hz y digitalizada a 3 kHz. Finalmente, el registro fue almacenado en una computadora para su análisis fuera de línea.

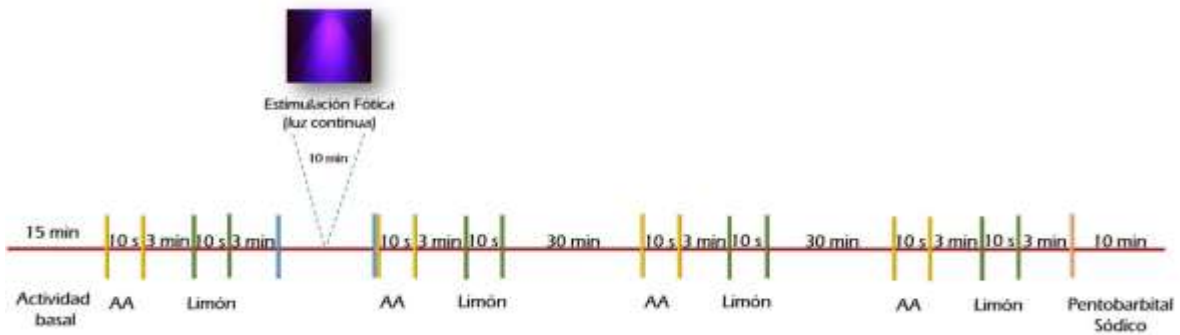


Figura 8.- Protocolo de estimulación sensorial y fótica con luz ultravioleta durante el registro de la actividad electrofisiológica *in vivo*. El esquema muestra los diferentes tiempos en los que se realizaron las siguientes condiciones de la actividad electrofisiológica del animal anestesiado: 15 min. de actividad basal previa a la luz; 10 segundos de estimulación olfatoria mediante la presentación de un hisopo con acetato de amilo (amarillo) y esencia de limón natural (verde); la estimulación durante 10 min. con luz ultravioleta continua que activa el compuesto PAM-FAM; la estimulación olfatoria a los 30 y 60 min posteriores a la presentación de la luz y la eutización del animal con una sobredosis de pentobarbital sódico.

5.6.1.4 Grupo Control: PAM-FAM (-) y luz ultravioleta

Se realizó el procedimiento de cirugía estereotáxica en ratones de la cepa silvestre C57BL/6 de 11 semanas de edad. Se dejó el animal en una incubadora durante tres y, posteriormente, se hizo el procedimiento de cráneo rebajado y registro de campo electrofisiológico (AP: 4.7 a partir bregma, ML: ± 0.7 a partir de la línea media, y DV: -1.7 a partir de la dura). El protocolo de estimulación sensorial y fótica se llevó a cabo de manera idéntica al descrito para el grupo experimental que fue inyectado con PAM-FAM, con las mismas condiciones de estimulación con luz ultravioleta (Fig. 8). La señal electrofisiológica registrada fue amplificada, filtrada en un rango de 1.5-3000 Hz y digitalizada a 3 kHz. Finalmente, el registro fue almacenado en una computadora para su análisis fuera de línea.

5.6.2 Grupo Experimental-activación optogenética de la microglía y su efecto en la detección olfatoria

Para evaluar el efecto de la activación microglial sobre la función del bulbo olfatorio se realizó una prueba conductual olfatoria en los ratones transgénicos obtenidos de la cruce de ratones CX3CR1-Cre /Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE que expresaron la ChR2 de manera endógena en la microglía. Para ello, se realizó la cirugía estereotáxica y la posterior implantación de LEDs diminutos (3 mm x 3 mm, 19 mW/mm², emisión a 460 nm) conectados dos pines hembra (Figura Anexa 1). El procedimiento se realizó de la siguiente manera: se hizo una craneotomía sobre ambos BO's como ha sido descrita anteriormente. De manera adicional, se agregaron gotas de cianocrilato sobre la superficie craneal y en la zona anterior a Bregma se realizó un trépano que permitió la colocación de un pequeño tornillo para tener una mayor fijación del implante. Posteriormente, con la ayuda de una torre estereotáxica se descendió el LED sobre el sitio de la craneotomía para ser fijado con cianocrilato. Finalmente, se recubrió toda la zona con acrílico dental (MDC Dental-NicTone R3V), dejando expuesta solamente los pines hembra. Los animales se devolvieron al bioterio para su recuperación durante una semana previa a la evaluación conductual; durante este período, los animales fueron alojados en oscuridad para evitar su exposición a la luz blanca.

Posterior a la recuperación de la cirugía, se llevó a cabo la prueba olfatoria del alimento enterrado en dos grupos diferentes de animales. Para el primer grupo, se realizó la prueba conductual en condiciones control (antes de la estimulación fótica) e inmediatamente después de la estimulación fótica (460 nm, 20 min continuos) para lo cual, el LED del implante fue conectado a un cable unido a una batería de 9V con una resistencia de 330 Ω .

La prueba conductual utilizada para evaluar la capacidad del animal para detectar un aroma fue la “prueba del alimento enterrado” (Burried food finding test) (Alvarado-Martínez, *et al.*, 2013), la cual consistió en la ubicación de 30 mg un trozo de galleta con chocolate (*triki trakes*) enterrado en una de las esquinas, de manera

aleatoria, de una caja inodora con aserrín nuevo (37.5 x 17 x 18 cm). El ratón fue depositado en la caja y se cronometró inmediatamente la latencia en encontrar la comida (definida como el tiempo para ubicar los alimentos e iniciar la excavación). Se cuantificó el tiempo en el que fue hallado el alimento durante un máximo de 10 min y, tan pronto como se descubrió el alimento, los sujetos se sacaron de la jaula. Todas las pruebas fueron realizadas bajo condiciones de luz roja (Figura Anexa 2).

6. Análisis de los datos

Todos los registros electrofisiológicos de campo se sometieron a un análisis para obtener espectros de potencia de la señal mediante el uso de la Transformada Rápida de Fourier (TRF). Con el apoyo del software pClamp 9.3. se aplicó la TRF en ventanas de 10 s en momentos diferidos durante 2 horas y media de la duración de los registros *in vivo*, como se menciona a continuación: 15 ventanas, 1 cada minuto en la condición basal (sin estimulación sensorial ni estimulación fótica); 1 ventana para el segmento “control” en el que se realizará la estimulación sensorial con acetato de amilo y limón (de manera independiente) previo a la estimulación con luz. Lo anterior, se repitió para el caso con el limón; 20 ventanas, una cada minuto durante la estimulación fótica sin la estimulación sensorial; 1 ventana para el segmento post-estímulo para acetato de amilo y limón inmediatamente después de finalizar la estimulación fótica. Este último protocolo fue repetido a los 30 min y 60 min post-estímulo. Finalmente, se obtuvo el espectro de potencia de 10 ventanas de la condición en presencia de pentobarbital sódico como prueba de viabilidad del registro electrofisiológico.

Se realizaron promedios de los espectros de potencia (en el rango de frecuencia de 1-60 Hz) de cada registro para cada condición. El mismo análisis se realizó para el caso del protocolo de estimulación con luz UV en animales inyectados con el fármaco PAM-FAM y para los respectivos grupos controles de estos grupos.

6.1 Análisis Estadístico

Los datos fueron procesados en un software de análisis estadístico (GraphPad Prism 6.0) en el cual fueron sometidos a las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y D'Agostino Pearson. Para evaluar las cuantificaciones de potencia de las distintas condiciones experimentales en la actividad espontánea (actividad basal, actividad durante la presentación de 20 min de luz continua y en presencia de pentobarbital sódico) se realizaron pruebas de ANOVA de muestras pareadas y comparaciones múltiples de Tukey de manera independiente para cada grupo. Posteriormente, con los datos obtenidos de estas cuantificaciones se realizó una comparación de la condición experimental entre grupos; para esto realizó una ANOVA de una vía de muestras independientes y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey entre grupos. En algunos casos se llevó a cabo pruebas de ANOVA de dos vías y pruebas *post hoc* de Bonferroni. Para evaluar la diferencia en el tiempo de exploración en la conducta olfatoria antes y después de la luz, se realizaron pruebas de t de student, correspondientes a cada uno de los dos grupos.

7. Resultados

7.1 Estandarización de las coordenadas de microinyección

Se realizó la estandarización de las coordenadas de inyección en la capa granular del BO, en ratones C57BL/6 machos de 8 semanas de edad. Se establecieron las coordenadas AP: 4.8 a partir Bregma, ML: ± 0.7 a partir de la línea media, y DV: - 1.7 a partir de la duramadre (Paxinos & Franklin, 2001), como el sitio adecuado de inyección. Para ello, se realizaron inyecciones con azul de pontamina (tinta azul) para la evaluación de estas coordenadas y posterior a distintas pruebas, con velocidades variadas de inyección, se establecieron los siguientes valores: 0.7 μ l de solución por cada BO a una velocidad de 0.1 μ l/min. Mediante el uso de un microscopio estereoscópico se pudo evaluar una adecuada difusión del volumen de tinta en la capa granular (Fig. 9).

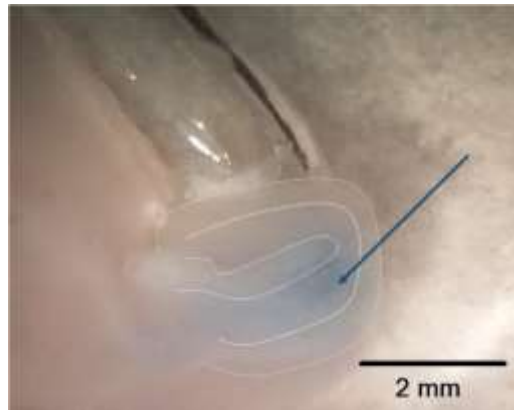


Figura 9.- Estandarización de las coordenadas de inyección con azul de pontamina. Microfotografía de un corte sagital del BO izquierdo de un ratón C57BL/6 de 8 semanas de edad. La flecha en azul muestra el área de difusión de la tinta principalmente en la capa granular del BO. Coordenadas de inyección: AP: 4.8 a partir bregma, ML: ± 0.7 a partir de la línea media, y DV: - 1.7 a partir de la dura. Imagen ampliada a 10X.

7.2 Verificación de la expresión de la ChR2 en la microglía del BO mediante imágenes de fluorescencia y estandarización del protocolo de fotoestimulación.

Para verificar la expresión de la ChR2-EYFP en la microglía del animal transgénico CX3CR1-Cre transfectado, se inyectaron 6 ratones de 8 semanas de edad con el vector adenoviral que indujo la expresión putativa de la ChR2 en la microglía. Al término de 20-24 días de expresión (tiempo promedio de la expresión de la ChR2: 21 días; Moriyoshi *et al.*, 1996), se obtuvieron rebanadas de 400 μm de grosor y mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia y se evaluó la expresión de esta opsina en la microglía (Fig. 10). Adicionalmente, se realizó la estimulación fónica en rebanadas durante 5 min, 10 min, 15 min, 20 min y 25 min con un LED de 460 nm para evaluar un posible cambio en la morfología de la microglía ante la estimulación fónica. Después de estas pruebas, se eligió realizar los experimentos posteriores con un tiempo de exposición a la luz azul de 20 min debido a que fue el tiempo en el que se observó un mayor cambio en la morfología celular a diferencia de la condición previa a la luz sin denotar un fotoblanqueo en el tejido (datos no mostrados).

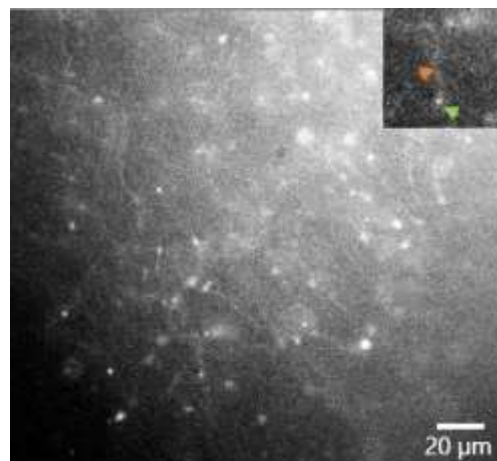


Figura 10.- Marcaje fluorescente de la EYFP que indica la presencia de ChR2 en la capa granular del BO en el ratón CX3CR1-Cre transfectado. Micrografías que muestran la expresión de la ChR2 marcada por la fluorescencia de la YFP en la población microglial de la capa granular del BO perteneciente a una rebanada sin fijar. El acercamiento muestra una célula en la que se indica un posible proceso microglial (punta de flecha naranja) y una zona fluorescente que pertenece a un posible soma (punta de flecha verde). Micrografía tomada a 20X.

También se tomaron micrografías de fluorescencia para ver la expresión de la EYFP en el tejido de ratones transgénicos CX3CR1-Cre/Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE que expresan putativamente a la ChR2 en la microglía (Fig. 11) por cruzamiento genético de las líneas parentales originales como se describe en Materiales y Métodos. Cabe mencionar que la marca fluorescente de esta línea de animales fue demasiado difusa en todo el BO, especialmente en la capa granular, de manera que esta gran marca fluorescente no nos permitió observar una distribución definida y específica de la marca de la proteína amarilla fluorescente en la mayoría de las rebanadas obtenidas con grosores de 100 μm y de 40 μm (Fig. 11 a,b). De manera muy esporádica se pudo observar una célula regularmente definida como se observan en la Fig. 11 c. Dadas las condiciones de la fluorescencia de fondo ampliamente encontrada en este animal transgénico, no se pudo observar definidamente la colocalización con marca Iba1 identificada por inmunohistoquímica (datos no mostrados).

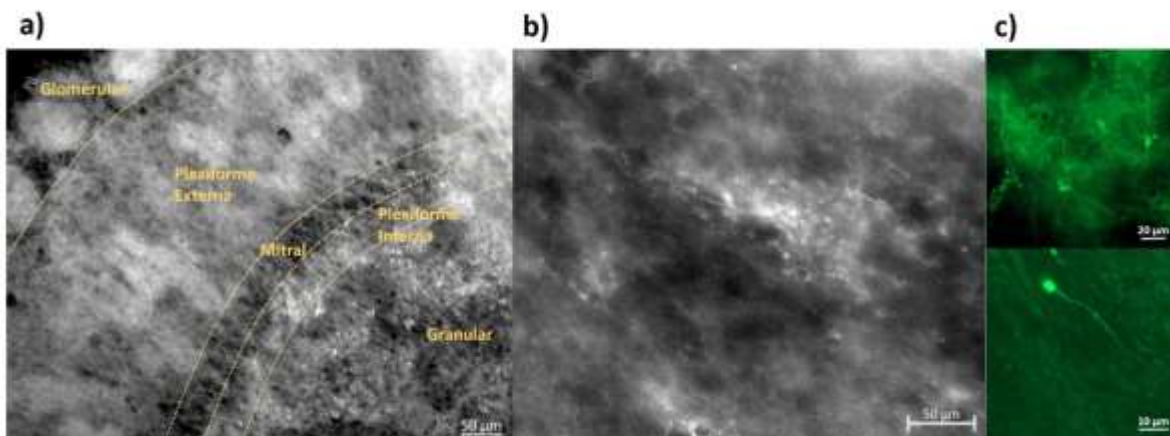


Figura 11.- Marcate fluorescente en el BO del ratón transgénico CX3CR1-Cre/Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE. Micrografía que muestra la marca fluorescente en rebanadas del BO. Se indica en a) una rebanada en fijación de 40 μm en donde se observa una marca fluorescente difusa en todas las capas del BO, incluyendo la capa granular. En b) se muestra la marca fluorescente hallada en la capa granular del BO en una rebanada sin fijar de 100 μm de grosor. En esta última imagen se observa la posible marca de la EYFP lo suficientemente intensa como para denotar el soma y procesos microgliales que contrastan con el fondo. Ambas micrografías fueron tomadas a 20X. c) Amplificación de una rebanada sin fijar a 80 μm , en donde se observa la fluorescencia de dos células que muestran que denotan procesos microgliales.

7.3 Verificación de la expresión de la GFP en el BO mediante imágenes de fluorescencia

Como control, se transfectaron 4 ratones transgénicos CX3CR1-Cre hembras de 8 semanas de edad con un vector lentiviral que indujo la expresión de la GFP de manera ubicua bajo el control del promotor del Virus Formador de Foco Esplénico (SFFV, por sus siglas en inglés). Al término de 22 días posteriores a la inyección, se obtuvieron rebanadas de 400 μm de grosor para observar la expresión de esta proteína en diferentes tipos celulares del BO (Fig. 12). Al comprobar la correcta expresión de esta proteína como consecuencia de las mismas condiciones experimentales de aquellas empleadas en la microinyección del vector viral que indujo la expresión de la ChR2, se determinó usar un grupo de animales control que expresaran GFP designado para el registro electrofisiológico que se mostrará posteriormente.

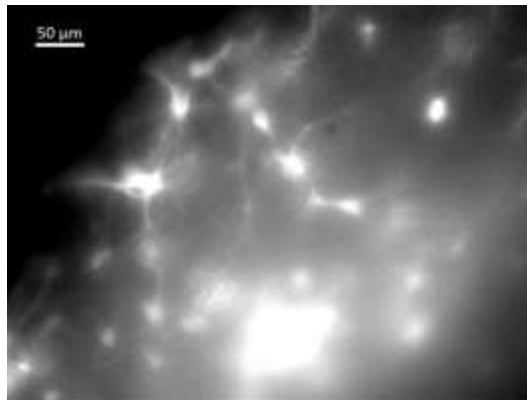


Figura 12.- Expresión de la GFP en la capa granular del BO por transfección viral. Se muestra una micrografía de epifluorescencia que muestra la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en una diversidad de tipos celulares en el bulbo olfatorio. Amplificación a 40X.

7.4 Verificación de la difusión del lipopéptido PAM-FAM mediante imágenes de fluorescencia

Con el fin de verificar la difusión y persistencia del lipopéptido PAM-FAM en el tejido bulbar, se inyectaron 3 ratones silvestres C57BL/6 de 11 semanas de edad con el fármaco a una concentración de 10 ng/ml. El fármaco se dejó incubar durante 3 horas y, posteriormente, se obtuvieron rebanadas de 400 μm de grosor. Mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia, se evaluó la presencia del fluoróforo en la microglía antes y después de la exposición a luz UV durante 10 min continuos (Fig. 13).

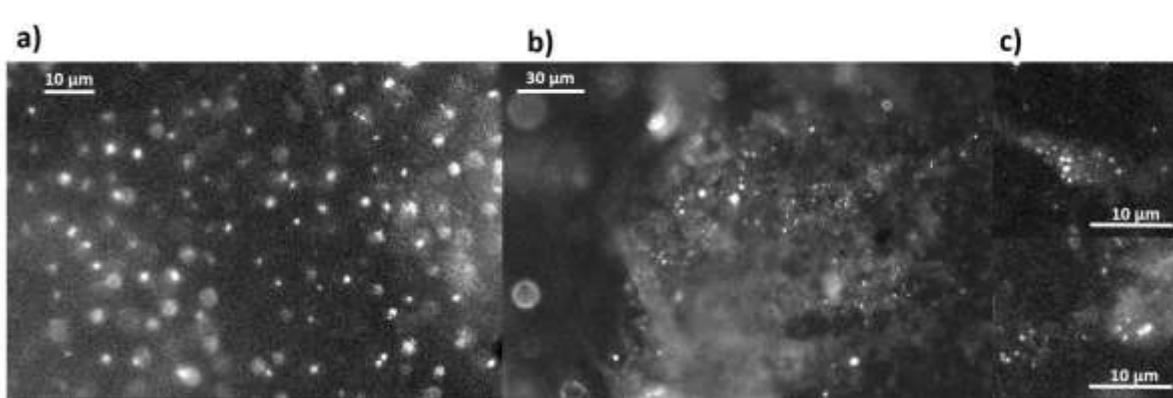


Figura 13.- Marcaje del lipopéptido PAM visualizado acoplado al fluoróforo 5/6 carboxifluoresceína. a) Micrografía de fluorescencia que muestra la presencia del fluoróforo en células putativas de la microglía en condiciones control y en **b)** 10 min después de la exposición a la luz UV para inducir la activación del lipopéptido PAM, agonista de los receptores TLR 2/6. Fotos tomadas con objetivos a 10X (**a y b**). Para apreciar mejor el efecto de la estimulación con luz UV sobre la fluorescencia, se muestran en **c)** acercamientos de dos fotos distintas tomadas a 40X.

Con el experimento descrito en el párrafo anterior se confirmó la presencia del fluoróforo que acompaña al lipopéptido PAM en el tejido bulbar incubado, además de que se determinó que la luz ultravioleta induce la activación de la microglía unida a este fármaco fotosensible. En base a lo anterior, un grupo de animales C-57 fue inyectado intrabulbarmente *in vivo* para llevar a cabo la activación de la microglía durante los registros electrofisiológicos.

7.5 Verificación de la expresión de la ChR2 de manera específica en la microglía mediante inmunohistoquímica

Con la finalidad de determinar si la ChR2 se expresó específicamente en la microglía, el tejido de los animales transfectados fue sometido a la detección inmunohistoquímica de la proteína Iba-1. La captura simultánea de imágenes de fluorescencia confirmó que la marca fluorescente de EYFP que indica la expresión de la ChR2 se ubicó en las células microgliales pues colocalizó con la marca Iba-1 (Fig. 14).

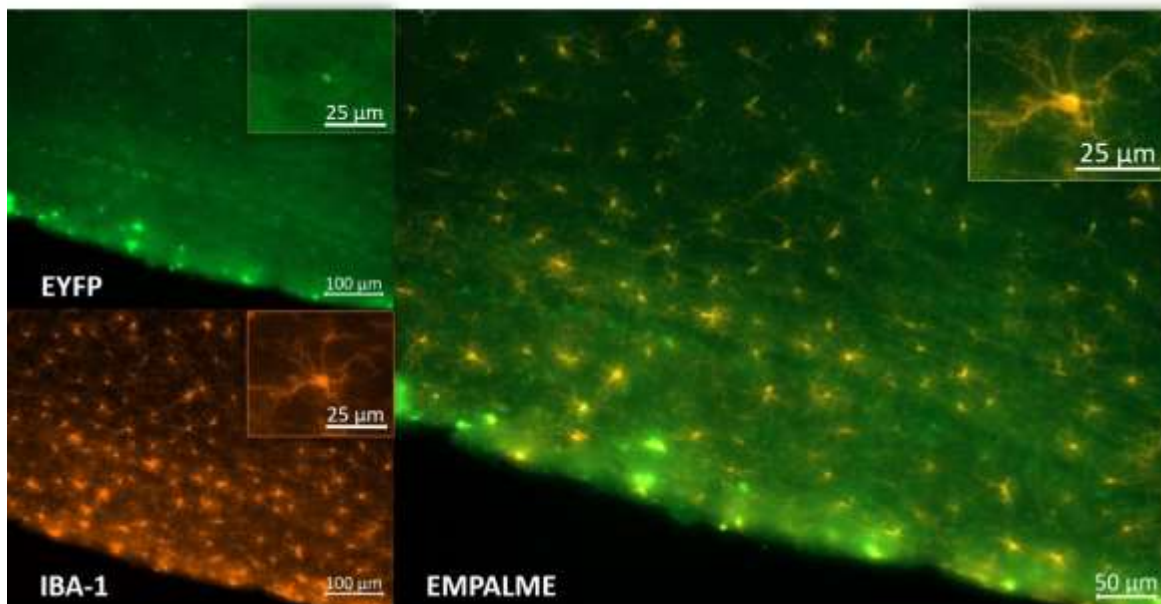


Figura 14.- Expresión de ChR2 en la microglía de la capa granular del BO de un ratón transfectado con un vector viral. Izquierda: Se muestran dos micrografías de fluorescencia que muestran la expresión de la EYFP (arriba) que indica la expresión de la ChR2 y la marca del fluoróforo Alexa 568 utilizado en el protocolo de inmunohistoquímica anti Iba-1, la cual indica la presencia de la microglía. A la derecha se muestra el empalme de ambas micrografías en el que se confirma que la fluorescencia proveniente de la EYFP en verde corresponde a los cuerpos y procesos microgliales definidos en color naranja. Amplificación a 20X.

En esta misma serie de experimentos también se evaluó el cambio morfológico de la microglía que expresa o no a la ChR2 ante la presencia de la luz azul. Lo anterior en animales transgénicos CX3CR1-Cre y CX3CR1-Cre/ROSACHR2 (Fig. 15). La microglía en condiciones control presentó una morfología típica de la microglía vigilante o ramificada con múltiples procesos expuestos y soma pequeño (Fig. 15). En cambio, las rebanadas que fueron expuestas a la luz y fijadas dos horas después de la fotoestimulación, mostraron una microglía con menor presencia de procesos, indicando la transición a un estado activo (Nimmerjahn *et al.*, 2005).

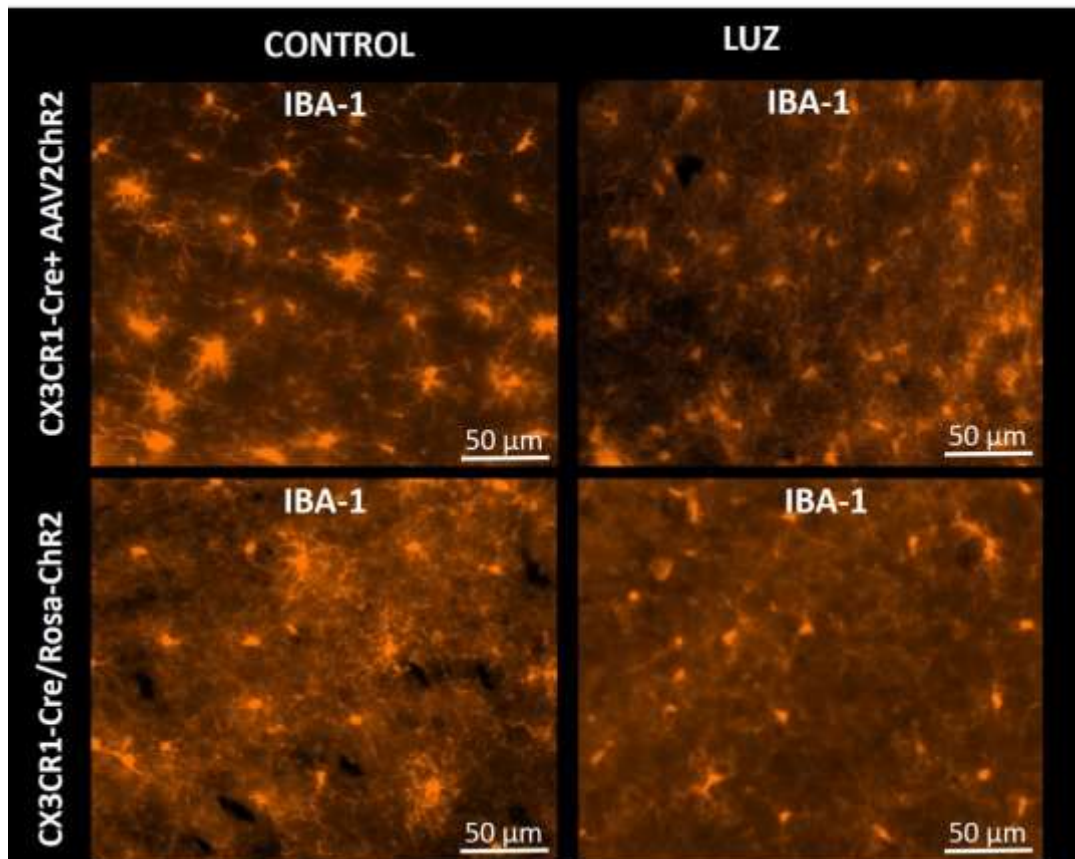


Figura 15.- Morfología microglial antes y después de la estimulación optogenética. Se muestran cuatro micrografías de la marca del fluoróforo Alexa 568 acoplado a la detección inmunohistoquímica de la Iba-1. A la izquierda se muestran las micrografías correspondientes a dos rebanadas control obtenidas de animales que expresaron la ChR2 en la microglía ya sea mediante la transfección viral o por retrocruza. Note la presencia de múltiples ramificaciones características de la microglía vigilante o en reposo. A la derecha se observan dos rebanadas diferentes de ambos tipos de animales que fueron expuestas a luz azul. Se observa una microglía menos ramificada en transición a un estado activo. Amplificación a 20X.

7.6 Genotipificación de los ratones transgénicos

Rutinariamente se realizó la genotipificación de los animales transgénicos que expresan a la recombinasa Cre y, al mismo tiempo, carecen de la secuencia del receptor CX3CR1, pues en el sitio donde se encontraba el gen que codifica para el receptor CX3CR1 se integró la secuencia que expresa la enzima recombinasa Cre (CX3CR1-Cre). El protocolo de genotipificación realizado con los oligonucleótidos que se describen en materiales y métodos, mostró que los animales carentes del receptor CX3CR1 no presentan el amplicón correspondiente a la parte del locus que contiene a este receptor y que correspondería a una banda de 816 pb (Fig. 16) mientras que presentan el amplicón de parte de la secuencia transgénica que corresponde a una banda de 380 pb (Fig. 16). Por su parte, los animales heterocigotos muestran ambos amplicones (Fig. 16).

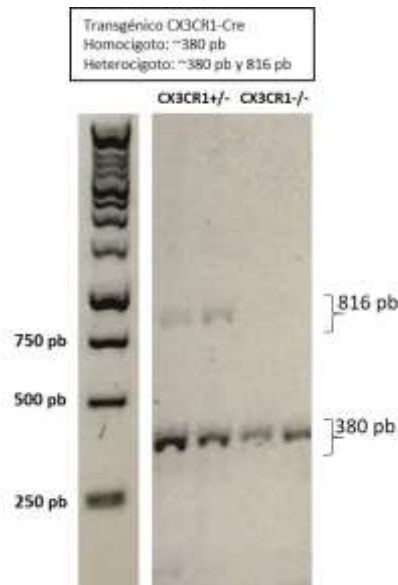


Figura 16.- Genotipificación de los ratones CX3CR1-Cre. Geles de agarosa con una escalera molecular de 250 pares de bases (pb, carril izquierdo) y los productos de la reacción de PCR correspondientes al tejido de cuatro diferentes animales genotipificados (carriles derechos). A la izquierda se muestran los amplicones de dos sujetos heterocigotos que presentan el amplicón de parte de la secuencia transgénica correspondiente a ~380 pb y el amplicón de parte del locus que contiene al receptor CX3CR1 correspondiente a ~816 pb. A la derecha se muestran los amplicones de dos sujetos homocigotos para la expresión de la secuencia transgénica y carentes del gen para el receptor CX3CR1. Los animales homocigotos se utilizaron para los experimentos de esta tesis.

Se realizó también la genotipificación de los animales transgénicos de la cruce CX3CR1-Cre/Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE. El protocolo de genotipificación fue realizado con los oligonucleótidos que se describen en materiales y métodos para esta cepa. Los geles de agarosa mostraron la heterocigocidad de estos ratones para ambos transgenes. Los resultados de la reacción de PCR mostraron que los animales presentaron el amplicón de parte del locus que contiene al receptor CX3CR1 (816 pb), así como el amplicón de una parte de la secuencia transgénica (380 pb). Adicionalmente, estos animales presentaron el amplicón de parte del locus que contiene al Rosa26 (297 pb), así como el amplicón de parte de la secuencia transgénica (212 pb) (Fig. 17).

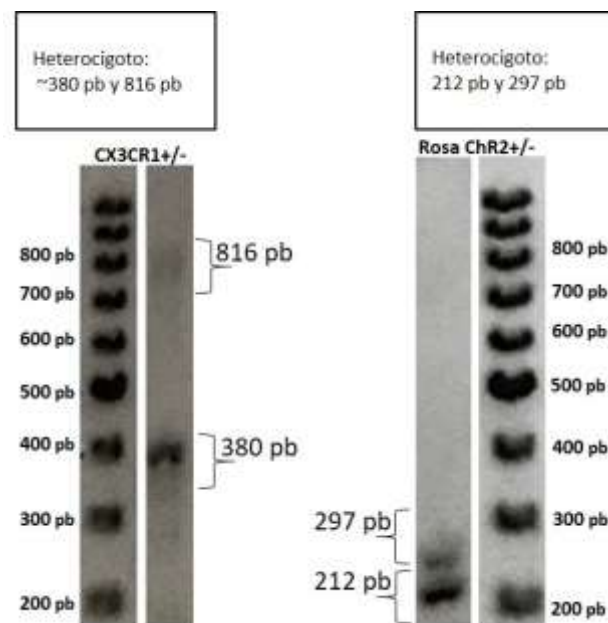


Figura 17.- Genotipificación de un ratón transgénico CX3CR1-Cre/Rosa-ChR2 que putativamente expresa a la ChR2 de manera específica en la microglía. Geles de agarosa con una escalera molecular de 100 pares de bases (pb, carriles de los extremos izquierdo y derecho) y la marca de la reacción de PCR correspondiente al tejido de un animal obtenido a partir de la cruce CX3CR1-Cre/Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE. En el gel izquierdo, se muestran los amplicones que demuestran la heterocigosidad con respecto al CX3CR1 (~816 pb) y la secuencia transgénica (~380 pb). En el gel derecho, se muestran los amplicones que demuestran la heterocigosidad con respecto al locus Rosa26 (297 pb), así como la secuencia transgénica asociada con la incorporación de la ChR2-YFP (212 pb). Los animales heterocigotos como el ejemplo que se muestra en esta figura fueron utilizados en esta tesis.

7.7 La activación optogenética de la microglía disminuye la actividad espontánea de la capa granular del BO *in vivo*

La actividad eléctrica espontánea *in vivo* de la capa granular del BO de ratones CX3CR1-Cre de 11 semanas de edad y anestesiados con uretano, fue evaluada 3 semanas después de la inyección del vector viral que indujo la expresión de la ChR2-YFP en la microglía, de la inyección del vector viral que indujo la expresión inespecífica de la GFP, así como animales control no transfectados. En los tres casos, la actividad del BO se mantuvo robusta y estable durante el periodo control (20 min en condiciones basales previas a la estimulación con luz azul) (Fig. 18 AB). La potencia de la actividad basal de los 3 grupos se utilizó para normalizar el resto del registro y su potencia se consideró como el 100% (N=6; Fig. 18C).

El análisis de potencia mostró una disminución en la actividad espontánea del BO durante la presentación de 20 min de luz continua en los animales que expresaron la ChR2 en la microglía. Esto se vio reflejado en una reducción del 39.05 ± 4.92 % de la potencia comparada con la de la actividad basal (N=6, Fig. 18 C; grupo representado como *ChR2 (+)*). Las pruebas de ANOVA de muestras pareadas y comparaciones múltiples de Tukey mostraron una diferencia significativa entre la condición basal y aquella en presencia de luz azul ($p < 0.001$). Por el contrario, esta disminución en la actividad espontánea del BO por la activación optogenética de la microglía con luz azul no ocurrió en los animales control que no expresaron a la ChR2 (N=6, Fig. 18 C; grupo representado como *ChR2 (-)*), en los cuales la potencia total de la actividad durante la presentación de la luz es del 106 ± 3.28 % de la actividad en la condición basal. Lo mismo ocurrió en el grupo que expresó a la GFP de manera inespecífica, en los cuales la potencia total de la actividad durante la presentación de la luz es del 109.75 ± 4.68 % de la actividad en la condición basal. Las pruebas de ANOVA de muestras pareadas y de comparaciones múltiples de Tukey arrojaron un valor de $p > 0.05$, N=6, para ambos grupos control cuando se compara la actividad bulbar durante la presencia de la luz azul en comparación con la actividad basal (Fig. 18 C).

La inyección i.p. de una sobredosis de pentobarbital sódico indujo una reducción significativa en la actividad espontánea del $88.15\% \pm 2.17\%$ ($p < 0.0001$) en el grupo experimental (ChR2(+)). Lo mismo ocurrió con los animales de los grupos control que presentaron una reducción del $93.49 \pm 0.53\%$ para el grupo ChR2 (-) y una reducción del $93.69 \pm 0.91\%$ para el grupo GFP ($p < 0.0001$ en la prueba de ANOVA de muestras pareadas y de comparaciones múltiples de Tukey para ambos grupos control; Figura 18C).

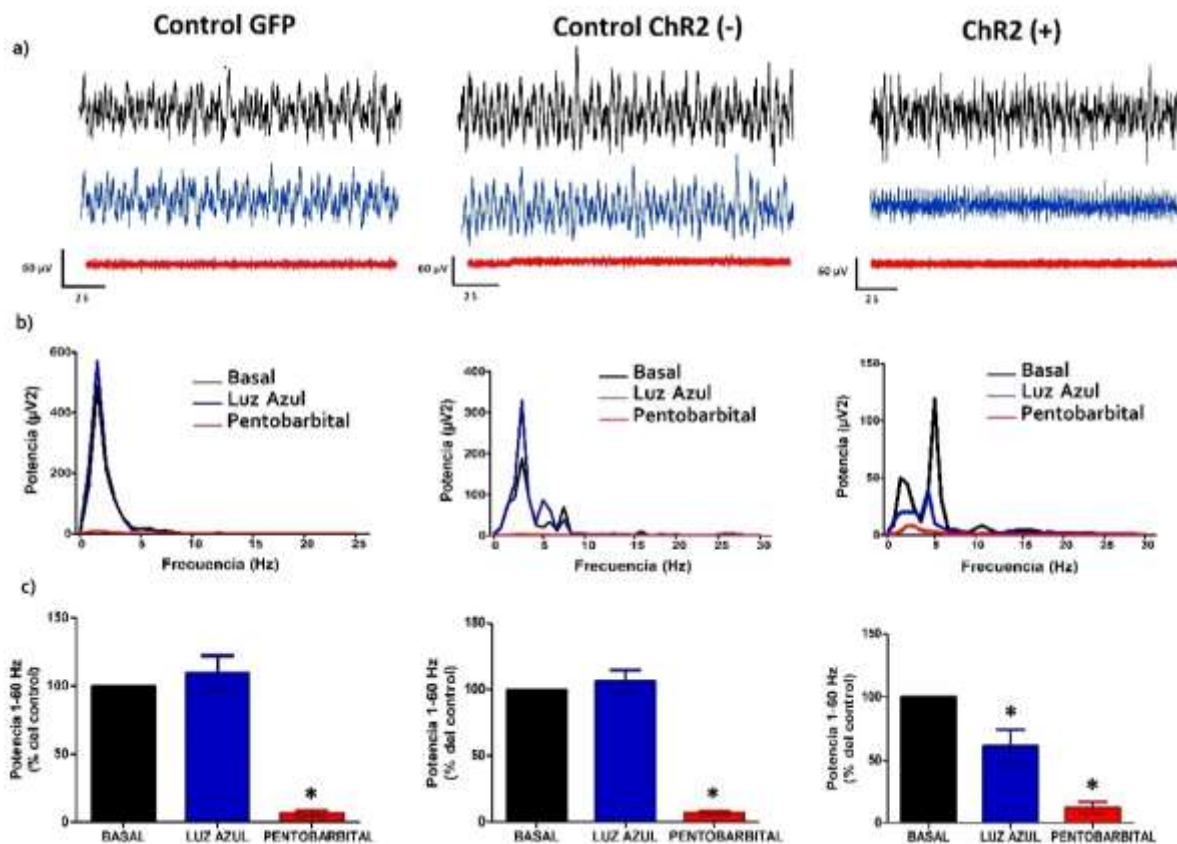


Figura 18.- La estimulación fótica disminuye la actividad espontánea de la capa granular del BO en ratones que expresan la ChR2 en la microglía. a) Trazos representativos del registro electrofisiológico *in vivo* de la capa granular del BO del grupo experimental que expresa ChR2 en la microglía (ChR2 (+)) y para los grupos controles no transfectados (ChR2 (-)) y transfectados con la GFP. En todos los casos se muestra la actividad en condiciones basales (negro), en presencia de luz azul continua durante 20 min (azul) y en presencia de pentobarbital sódico (rojo). **b)** Gráficas del espectro de potencia promedio de las condiciones basal negro), en presencia de luz azul continua durante 20 min (azul) y en presencia de pentobarbital sódico (rojo). N=6 para todos los grupos. **c)** Cuantificación de la potencia normalizada con respecto a la condición basal (tomada como el 100%). Se observa una disminución significativa de la potencia total de las frecuencias de 1-60 Hz posterior a la estimulación fótica en el grupo experimental, que no se observa en los grupos control. También se observan diferencias significativas para todos los grupos entre la condición basal y la posterior aplicación de pentobarbital sódico. Los histogramas representan las medias \pm EEM. Datos analizados con pruebas de ANOVA de una vía de medidas repetidas y comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas con respecto a la actividad basal con una $p < 0.001$ entre la condición basal y la actividad en presencia de luz en el grupo ChR2 (+) y una $p < 0.0001$ entre la actividad basal y la actividad después de la aplicación de pentobarbital para los 3 grupos.

La comparación estadística de la potencia de la actividad de la condición experimental (durante la presencia de 20 min de luz azul), normalizada respecto a las condiciones control y comparada entre los 3 grupos permitió corroborar que solamente existió una reducción significativa en la potencia total del grupo que expresó ChR2, que mostró una diferencia significativa con respecto a los grupos control ($p < 0.05$), según la prueba de ANOVA de una vía de muestras independientes y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey entre el grupo ChR2 (+) y ambos grupos control, $N = 6$. Por otra parte, no se hallaron diferencias significativas entre la potencia total del grupo control ChR2 (-) y del grupo control GFP ($p > 0.05$; $N = 6$ para ambos grupos; Figura 19).

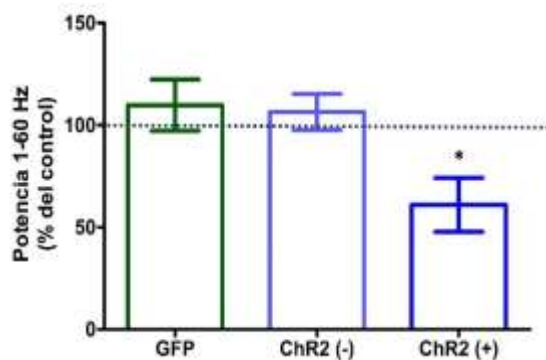


Figura 19.- Comparación del efecto inducido por la estimulación fótica en la potencia de la actividad de la capa granular del BO del grupo de ratones que expresaron ChR2 en la microglía y de los grupos control. Cuantificación de la potencia normalizada con respecto a la condición basal correspondiente a cada grupo (tomada como el 100%, línea punteada). Se incluyen el grupo experimental ChR2 (+) y los dos grupos control ChR2 (-) y GFP. Los histogramas representan las medias \pm EEM. La prueba ANOVA de una vía y la de comparaciones múltiples de Tukey denotaron una diferencia significativa de la potencia entre el grupo ChR2 (+) en comparación con los grupos control, representada con un asterisco ($p < 0.05$).

7.8 La activación optogenética de la microglía disminuye el incremento en la potencia de la actividad inducida en la capa granular del BO por exposición al acetato de amilo

Con la finalidad de evaluar el efecto de la estimulación fónica de la microglía sobre la actividad oscilatoria inducida por olores, se realizaron registros electrofisiológicos *in vivo* de la capa granular del BO de ratones TR-CX3CR1-Cre de 11 semanas de edad transfectados para inducir la expresión de la ChR2 en la microglía, los cuales fueron expuestos durante 10 segundos a acetato de amilo en las narinas. Este protocolo estimulación con acetato de amilo se realizó en la condición basal (previa a la estimulación de luz azul continua durante 20 min), inmediatamente después de la estimulación fónica, así como 30 min y 60 min posteriores a la estimulación fónica. Lo último, con la finalidad de evaluar la persistencia del efecto de la activación optogenética de la microglía. Cabe mencionar que se realizó el promedio de las potencias en el rango de 1-60 Hz obtenidas de tres ensayos de la exposición al odorante en cada condición experimental. La aplicación de acetato de amilo en las narinas induce un incremento en la potencia de la actividad del BO de $16130.44 \pm 1496.68 \mu V^2$. Este incremento en condiciones basales se consideró la respuesta control normalizada (considerada el 100 %) y el resto de las estimulaciones se normalizaron con respecto a esta respuesta. La cuantificación de la potencia normalizada mostró que la estimulación fónica de la microglía indujo un decremento en la potencia de la actividad inducida del $56.88 \pm 5.09\%$ del control cuando es evaluada al finalizar la estimulación fónica, del $58.73 \pm 3.15\%$ cuando es evaluada 30 min posteriores a la estimulación fónica y del $61.68 \pm 3.74\%$ cuando es evaluada 60 min posteriores a la estimulación fónica (N=6, Fig. 20 C). Las pruebas de ANOVA de muestras pareadas y de comparaciones múltiples de Tukey mostraron una diferencia significativa entre la condición control en comparación con la actividad post-estímulo ($p < 0.001$), así como en comparación con la actividad 30 min ($p < 0.001$) y 60 min post-estímulo ($p < 0.001$).

El decremento en la actividad inducida durante la exposición a acetato de amilo en los animales que expresan ChR2 en la microglía y que son estimulados con luz azul,

no se produjo en los animales del grupo control que no fueron transfectados, ChR2 (-), y que fueron evaluados también inmediatamente después del estímulo fótico. La actividad inducida por acetato de amilo post-estímulo fótico representa el $95.28 \pm 3.35\%$ de la actividad control. La actividad inducida por acetato de amilo a los 30 min posteriores al estímulo fótico representa el $99.12 \pm 3.36\%$ de la actividad control y la actividad inducida por acetato de amilo a los 60 min posteriores al estímulo fótico representa el $99.32 \pm 6.38\%$ de la actividad control. El ANOVA de muestras pareadas y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey no arrojaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para las tres condiciones experimentales (N=6). Lo mismo ocurre en el grupo control GFP pues la actividad inducida por acetato de amilo post-estímulo fótico representa el $103 \pm 2.99\%$ de la actividad control. La actividad inducida por acetato de amilo a los 30 min posteriores al estímulo fótico representa el $92.99 \pm 3.98\%$ de la actividad control y la actividad inducida por acetato de amilo a los 60 min posteriores al estímulo fótico representa el $90.07 \pm 2.94\%$ de la actividad control. El ANOVA de muestras pareadas y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey no arrojaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para las tres condiciones experimentales (N=6).

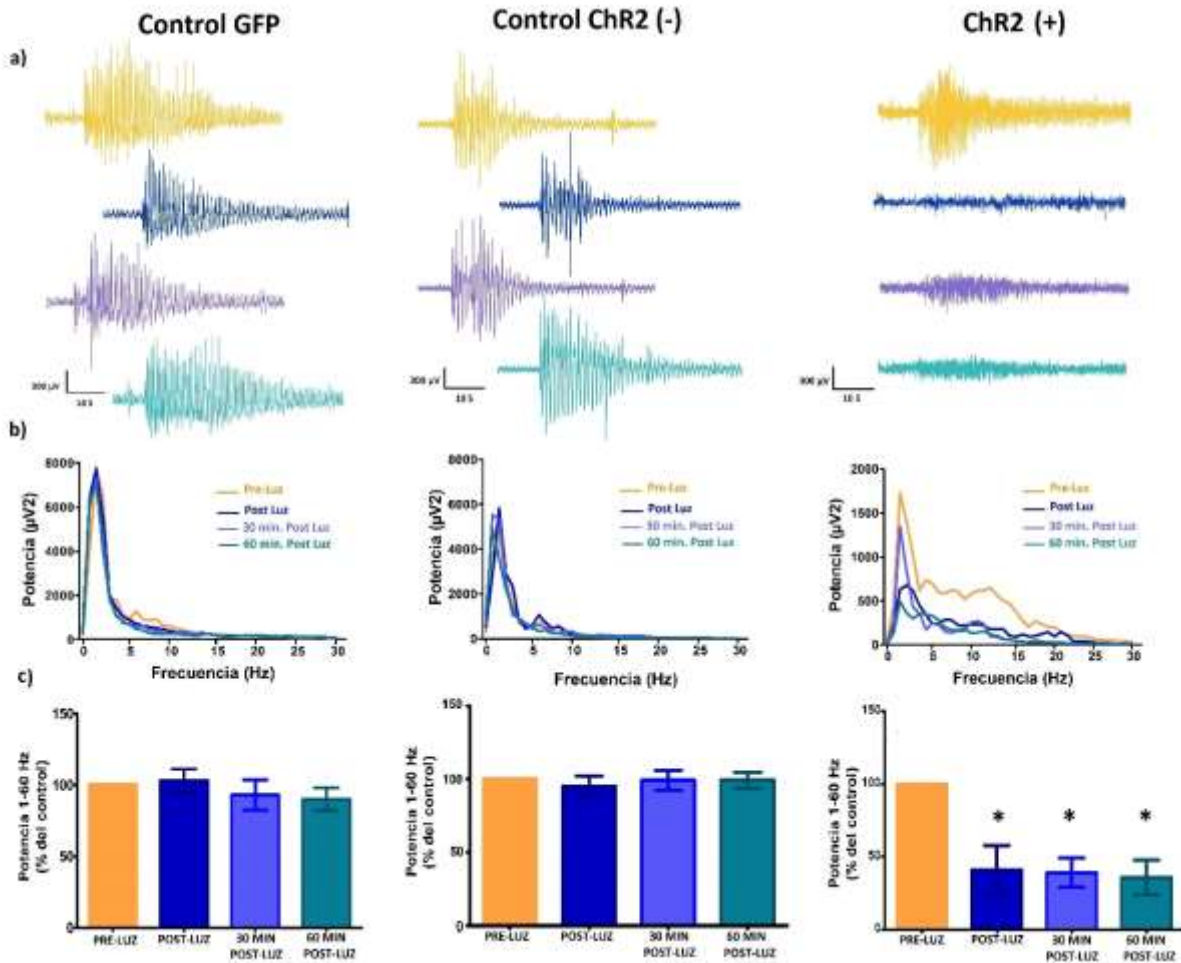


Figura 20.- La estimulación fótica disminuye la actividad inducida por acetato de amilo en la capa granular del BO en ratones que expresan la ChR2 en la microglía. **a)** Trazos representativos del registro electrofisiológico *in vivo* de la actividad inducida por acetato de amilo en la capa granular del BO del grupo experimental que expresa ChR2 en la microglía (ChR2 (+)) y para los grupos controles no transfectados (ChR2 (-)) y transfectados con la GFP. En todos los casos se muestra la actividad en condiciones basales (amarillo), posterior al estímulo de luz azul (azul), 30 min post-estímulo (azul claro) y 60 min post-estímulo (verde agua). **b)** Gráficas del espectro de potencia promedio de las condiciones basales (amarillo), en presencia de luz azul continua durante 20 min (azul), 30 min post-estímulo (azul claro) y 60 min post-estímulo (verde agua). N=6 para todos los grupos. **c)** Cuantificación de la potencia normalizada con respecto a la condición control (tomada como el 100%) para las condiciones experimentales del protocolo de registro. Los histogramas representan las medias \pm EEM. Los grupos fueron analizados con una ANOVA de muestras múltiples de Tukey; los asteriscos representan una diferencia significativa entre la condición control en comparación con la actividad post-estímulo ($p < 0.001$), la actividad 30 min. post-estímulo ($p < 0.001$) y 60 min. post-estímulo ($p < 0.001$) para el grupo ChR2 (+). Este efecto no es observado en ninguno de los grupos control; $p > 0.05$.

La comparación de la actividad inducida por acetato de amilo entre el grupo experimental ChR2 (+) y los grupos control ChR2 (-) y GFP denotó una diferencia significativa. La potencia de la actividad inducida por acetato de amilo que corresponde a las condiciones experimentales fue cuantificada y normalizada respecto a las condiciones control correspondiente a cada uno de los tres grupos experimentales (la línea punteada representa el 100 % de la potencia cuantificada). Se halló una diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$), según las pruebas de ANOVA de dos vías y pruebas post-Hoc de Bonferroni, particularmente entre el grupo ChR2 (+) y ambos grupos control; $N=6$ en las tres condiciones de tiempo (post-estimulación, 30 min y 60 min posteriores a la estimulación con luz azul). Por otra parte, no se hallaron diferencias significativas entre la potencia total del grupo ChR2 (-) y el grupo GFP en ninguna de las tres condiciones de tiempo ($p > 0.05$; $N=6$ para ambos grupos control). Figura 21.

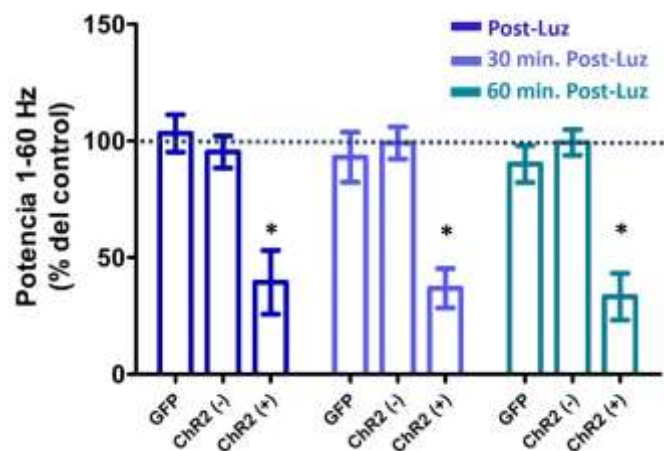


Figura 21.- Comparación del efecto inducido por la fotoestimulación en la actividad inducida por acetato de amilo en la capa granular del BO de los ratones que expresaron ChR2 en la microglía y de los grupos control. Cuantificación de la potencia normalizada con respecto a la condición basal de cada grupo (tomada como el 100%). Se incluyen el grupo experimental ChR2 (+) y los dos grupos control ChR2 (-) y GFP, así como las condiciones post-estímulo, 30 min y 60 min posteriores a la estimulación con luz azul. Los histogramas representan las medias \pm EEM. La prueba ANOVA de dos vías y comparaciones *post hoc* de Bonferroni denotaron una diferencia significativa de la potencia entre el grupo ChR2 (+) y ambos grupos control en las tres condiciones de tiempo representada por un asterisco, $p < 0.05$. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos control ($p > 0.05$).

7.9 La activación optogenética de la microglía disminuye el incremento en la potencia de la actividad inducida en la capa granular del BO por exposición a esencia de limón

El análisis descrito anteriormente para la exposición con acetato de amilo fue realizado de la misma manera para evaluar el efecto de la estimulación fótica de la microglía sobre la actividad oscilatoria inducida por la exposición a esencia de limón. La exposición al odorante se realizó durante 10 segundos para la condición basal (previo a la estimulación fótica), posterior a la estimulación, así como a los 30 min y 60 min posteriores a la estimulación fótica.

La aplicación de esencia de limón en las narinas induce un incremento en la potencia de la actividad del BO de $6327.08 \pm 1040.37 \mu V^2$. Este incremento en condiciones basales se consideró como 100 % de la respuesta control y el resto de las estimulaciones se normalizaron con respecto a esta respuesta. Tal como se reporta para la actividad inducida por acetato de amilo, la cuantificación de la potencia normalizada mostró que la estimulación fótica de la microglía indujo un decremento en la potencia de la actividad inducida por esencia de limón del $40.62 \pm 4.68\%$ del control cuando es evaluada al finalizar la estimulación fótica, así como del $58.14 \pm 4.16\%$ cuando es evaluada 30 min posteriores a la luz y de $60.98 \pm 3.73\%$ cuando es evaluada 60 min posteriores a la estimulación fótica. Las pruebas de ANOVA de muestras pareadas y de comparaciones múltiples de Tukey mostraron una diferencia significativa entre la condición control y la actividad post-estímulo ($p < 0.001$), así como en comparación con la actividad 30 min post-estímulo ($p < 0.0001$) y 60 min post-estímulo ($p < 0.0001$). (N=6, Fig. 22 C).

El decremento en la actividad inducida durante la exposición a esencia de limón en los animales que expresan ChR2 en la microglía y que son estimulados con luz azul, no se produjo en los animales del grupo control que no fueron transfectados (ChR2 (-)) y que fueron evaluados también inmediatamente después del estímulo fótico. La actividad inducida por esencia de limón representa el $103.43 \pm 1.42\%$ de la actividad control. La actividad inducida por esencia de limón a los 30

min posteriores al estímulo fótico representa el $93.65 \pm 1.59\%$ de la actividad control y la actividad inducida por esencia de limón a los 60 min posteriores al estímulo fótico representa el $99.67 \pm 1.34\%$ de la actividad control. El ANOVA de muestras pareadas y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey no arrojaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para las tres condiciones experimentales (N=6). Lo mismo ocurre en el grupo control GFP pues la actividad inducida por esencia de limón post-estímulo fótico representa el $95.97 \pm 6.86\%$ de la actividad control. La actividad inducida por esencia de limón a los 30 min posteriores al estímulo fótico representa el $85.86 \pm 3.99\%$ de la actividad control) y la actividad inducida por esencia de limón a los 60 min posteriores al estímulo fótico representa el $91.39 \pm 3.44\%$ de la actividad control. El ANOVA de muestras pareadas y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey no arrojaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para las tres condiciones experimentales (N=6).

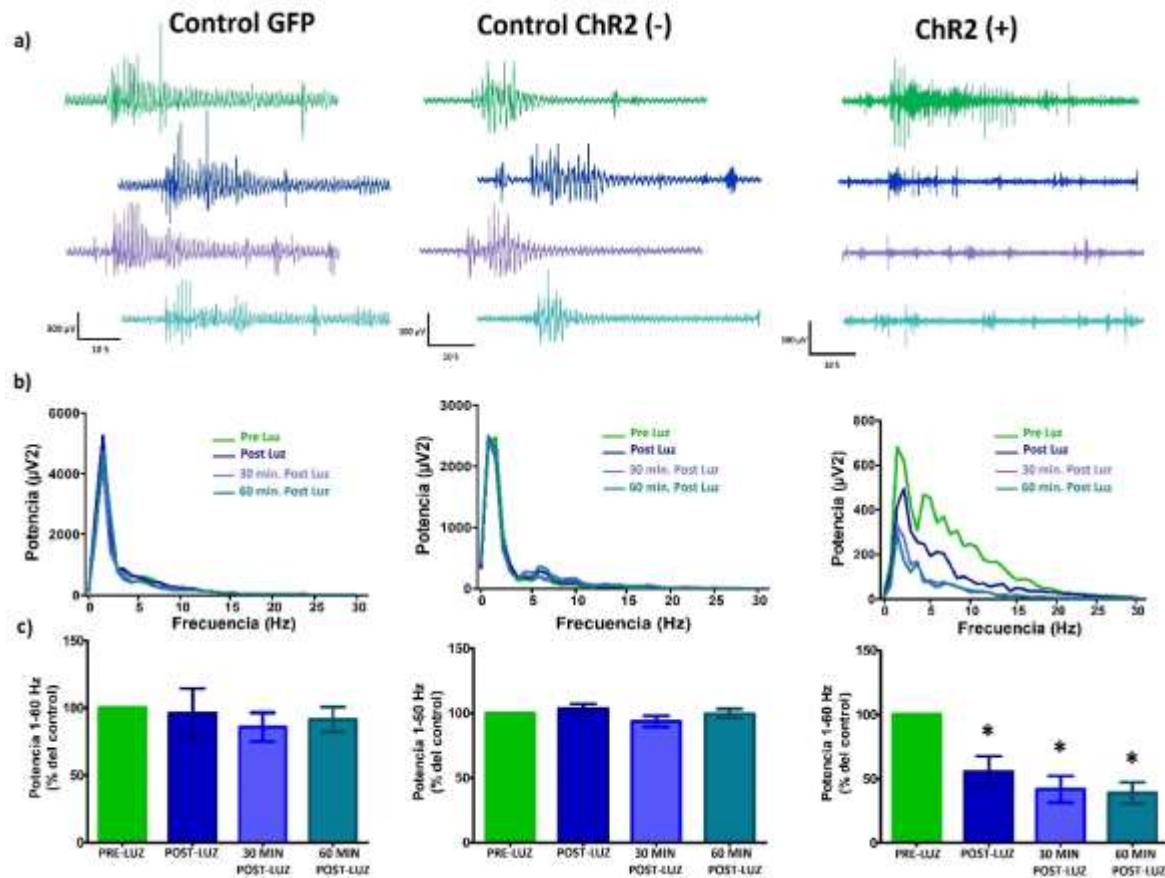


Figura 22.- La estimulación fótica disminuye la actividad inducida por esencia de limón en la capa granular del BO en ratones que expresan ChR2 en la microglía. a) Trazos representativos del registro electrofisiológico *in vivo* de la actividad inducida por esencia de limón en la capa granular del BO del grupo experimental que expresa ChR2 en la microglía (ChR2 (+)) y para los grupos controles no transfectados (ChR2 (-)) y transfectados con la GFP. En todos los casos, se muestra la actividad en condiciones basales (verde), posterior al estímulo de luz azul (azul), 30 min post-estímulo (azul claro) y 60 min post-estímulo (verde agua). **b)** Gráficas del espectro de potencia promedio de las condiciones basales (verde), en presencia de luz azul continua durante 20 min (azul), 30 min post-estímulo (azul claro) y 60 min post-estímulo (verde agua). N=6 para todos los grupos. **c)** Cuantificación de la potencia normalizada con respecto a la condición control (tomada como el 100%) para las condiciones experimentales del protocolo de registro. Los histogramas representan la media \pm EEM. Los grupos fueron analizados con una ANOVA de muestras pareadas y comparaciones múltiples de Tukey; los asteriscos representan una diferencia significativa entre la condición control y la actividad post-estímulo ($p < 0.001$), la actividad 30 min. post-estímulo ($p < 0.0001$) y 60 min. post-estímulo ($p < 0.0001$) para el grupo ChR2 (+). Este efecto no es observado en ninguno de los grupos control; $p > 0.05$.

La comparación estadística de la actividad inducida por esencia de limón entre el grupo experimental ChR2 (+) y los grupos control ChR (-) y GFP denotó una diferencia significativa. La potencia de la actividad inducida por esencia de limón fue cuantificada y normalizada respecto a las condiciones control de los tres grupos experimentales (la línea punteada representa el 100 % de la potencia cuantificada). Según las pruebas de ANOVA de dos vías y pruebas post-Hoc de Bonferroni, se encontró una diferencia significativa entre el grupo ChR2 (+) y ambos grupos control ChR2 (-) y GFP ($p < 0.001$, $p < 0.05$, respectivamente; $N=6$) en las tres condiciones de tiempo (post-estimulación, 30 min y 60 min posteriores a la estimulación con luz azul). Por otra parte, no se hallaron diferencias significativas en la potencia total entre el grupo control ChR2 (-) y el grupo control GFP en ninguna de las tres condiciones de tiempo ($p > 0.05$; $N=6$ para ambos grupos control; Figura 23).

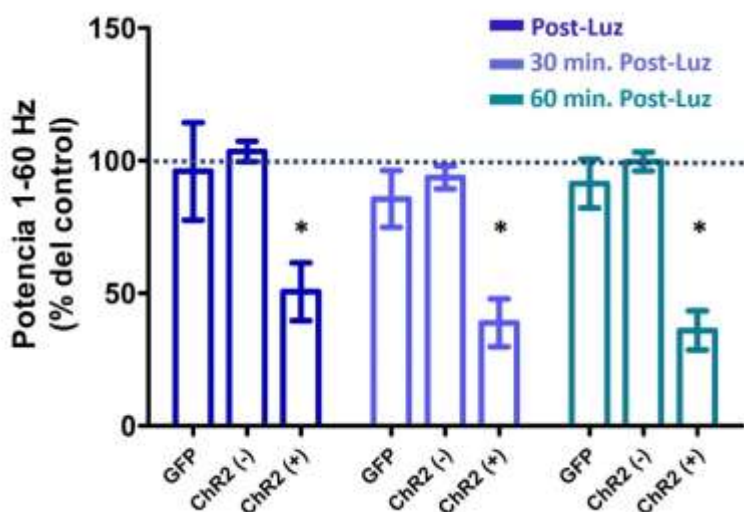


Figura 23.- Comparación del efecto inducido por la fotoestimulación en la actividad inducida por esencia de limón en la capa granular del BO de los ratones que expresaron ChR2 en la microglía y de los grupos control. Cuantificación de la potencia normalizada con respecto a la condición basal que corresponde a cada grupo (tomada como el 100%). Se incluyen el grupo experimental ChR2 (+) y los dos grupos control ChR (-) y GFP así como las condiciones post-estímulo, 30 min y 60 min posteriores a la estimulación con luz azul. Los histogramas representan las medias \pm EEM. La prueba ANOVA de dos vías y comparaciones *post hoc* de Bonferroni denotaron una diferencia significativa entre la potencia del grupo ChR2 (+) y el grupo ChR2 (-) con una $p < 0.05$ y $p < 0.001$ en comparación con el grupo GFP, representada por un asterisco en las tres condiciones de tiempo. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos control ($p > 0.05$).

7.10 La modulación microglial mediante la activación del lipopéptido PAM-FAM disminuye el incremento en la potencia de la actividad inducida en la capa granular del BO por exposición al acetato de amilo

Con la finalidad de evaluar el efecto de la activación microglial sobre la actividad oscilatoria inducida por aromas de una manera alternativa a la estimulación optogenética, se realizaron registros electrofisiológicos *in vivo* de la capa granular del BO de ratones C-57 de 11 semanas de edad anestesiados con uretano, los cuales fueron inyectados intrabulbarmente con el lipopéptido PAM-FAM 3 horas antes del registro, como se detalla en los materiales y métodos. Se realizó el mismo protocolo de estimulación olfatoria durante 10 segundos con acetato de amilo en las narinas en la condición basal (previo a la estimulación con luz UV continua durante 10 min), inmediatamente después de la estimulación con luz, así como 30 min y 60 min posteriores a la estimulación con luz. Para el análisis de este protocolo también se realizó el promedio de las potencias espectrales obtenidas de tres repeticiones de la exposición al odorante en cada condición. La aplicación de acetato de amilo en las narinas induce un incremento en la potencia de la actividad del BO de $17013.05 \pm 3550.99 \mu V^2$. Este incremento en condiciones basales se consideró como 100 % de la respuesta control y el resto de las estimulaciones se normalizaron con respecto a esta respuesta. La cuantificación de la potencia normalizada mostró que la activación del PAM-FAM provocó una disminución en la potencia de la actividad inducida del $50.46 \pm 0.84\%$ del control cuando es evaluada al finalizar la exposición a la luz UV, así como del $61.25 \pm 4.57\%$ del control cuando es evaluada 30 min posteriores a la estimulación fótica y del $61.83 \pm 3.33\%$ del control cuando es evaluada 60 min posteriores a la estimulación fótica (N=6, Fig. 24 C). Las pruebas de ANOVA de medidas repetidas y de comparaciones múltiples de Tukey mostraron una diferencia significativa entre la condición basal en comparación con la actividad post-estímulo, así como en comparación con la actividad 30 min post-estímulo y 60 min post-estímulo ($p < 0.0001$ para las tres condiciones). El decremento en la actividad inducida durante la exposición a acetato de amilo en los animales que expresan ChR2 en la microglía y que son estimulados con luz UV, no se produjo en

los animales del grupo control C-57 sin inyección intrabulbar de PAM-FAM y que fueron evaluados inmediatamente después del estímulo fótico. La actividad inducida por acetato de amilo representa el 92.56 ± 1.20 % de la actividad control. La actividad inducida por acetato de amilo a los 30 min posteriores al estímulo fótico representa el 90.36 ± 0.89 % de la actividad control y la actividad inducida por acetato de amilo a los 60 min posteriores al estímulo fótico representa el 90.22 ± 1.75 % de la actividad control. El ANOVA de muestras pareadas y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey no arrojaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para las tres condiciones experimentales (N=6).

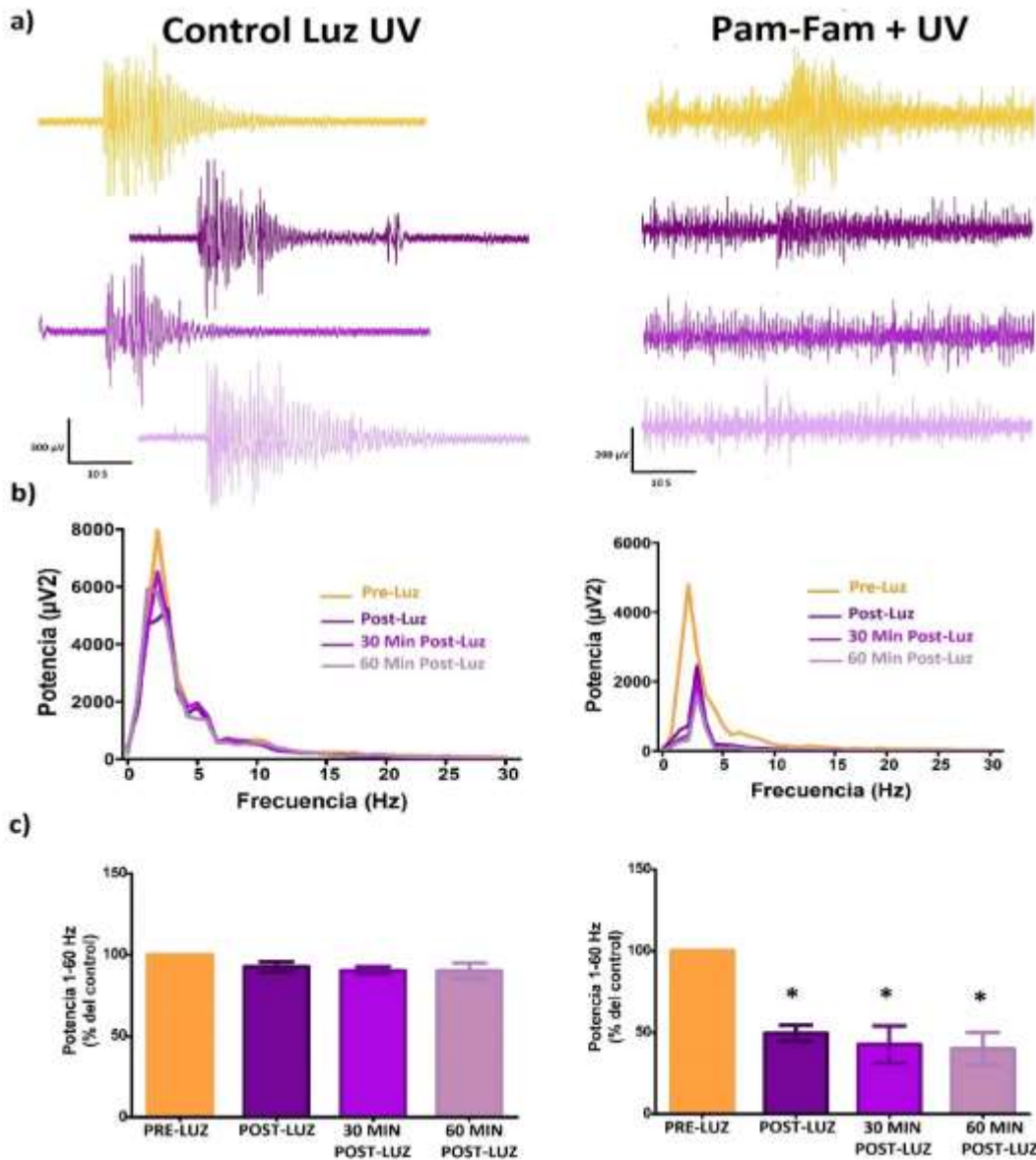


Figura 24.- La activación microglial putativa mediante el fármaco PAM-FAM disminuye la actividad inducida por acetato de amilo en la capa granular del BO en ratones C-57. a) Se muestran trazos representativos del registro electrofisiológico *in vivo* de la actividad inducida por acetato de amilo en la capa granular del BO del grupo experimental PAM-FAM inyectado intrabulbarmente y el grupo control sin la inyección. En todos los casos se muestra la actividad en condiciones basales (amarillo), posterior a la presentación de luz UV (violeta), 30 min post-estímulo (morado claro) y 60 min post-estímulo (morado claro). **b)** Gráficas del espectro de potencia promedio de la condición basal (amarillo), post-estímulo (violeta), 30 min post-estímulo (magenta) y 60 min post-estímulo (morado claro). N=6 para ambos grupos. **c)** Cuantificación de la potencia normalizada con respecto al control (tomado como el 100%). Los histogramas representan las medias \pm EEM; los grupos en c) fueron analizados con una ANOVA de muestras pareadas y comparaciones múltiples de Tukey; los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas con respecto a la actividad basal ($p < 0.0001$) para el grupo experimental.

La comparación estadística de la actividad inducida por acetato de amilo entre el grupo experimental PAM-FAM (+) y el grupo control mostró una diferencia significativa. La potencia de la actividad inducida por acetato de amilo posterior a la presentación de la luz fue cuantificada y normalizada. Se halló una diferencia significativa entre los dos grupos en la actividad evaluada después de la estimulación a la luz ($p < 0.05$); 30 min posteriores a la estimulación con la luz ($p < 0.001$), y 60 min posteriores a la estimulación con la luz ($p < 0.001$) según las pruebas de ANOVA de dos vías y pruebas post-Hoc de Bonferroni; $N=6$. Figura 25.

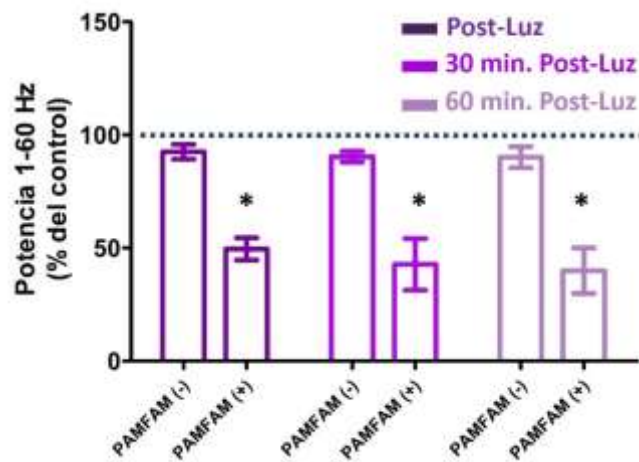


Figura 25.- Comparación del efecto inducido por la estimulación con luz UV en la actividad inducida por acetato de amilo en la capa granular del BO de los ratones C57BL/6 inyectados intrabulbarmente con PAM-FAM y del grupo control. Cuantificación de la potencia normalizada con respecto a la condición control (tomada como el 100%). Se incluyen el grupo experimental PAM-FAM (+) y el grupo control PAM-FAM (-), así como las condiciones post-estímulo, 30 min y 60 min posteriores a la estimulación con luz ultravioleta. Los histogramas representan las medias \pm EEM. Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA de dos vías y comparaciones *post hoc* de Bonferroni; los asteriscos representan una diferencia significativa de la potencia entre el grupo PAM-FAM (+) y el grupo control PAM-FAM (-) ($p < 0.05$).

7.11 La modulación microglial mediante la activación del lipopéptido PAM-FAM disminuye el incremento en la potencia de la actividad inducida en la capa granular del BO por exposición a esencia de limón

El análisis descrito anteriormente para la activación microglial por la estimulación fótica del PAM-FAM en presencia de acetato de amilo fue realizado de la misma manera para evaluar el efecto de la estimulación de luz ultravioleta sobre la actividad oscilatoria inducida por la exposición a esencia de limón. La exposición al odorante se realizó durante 10 segundos para la condición basal (previo a la estimulación fótica), inmediatamente después de la estimulación con luz, así como 30 min y 60 min posteriores a la estimulación fótica.

De manera similar a lo que se reporta para la actividad inducida por acetato de amilo, la cuantificación de la potencia mostró que la activación del PAM-FAM provocó una disminución en la potencia de la actividad inducida por esencia de limón del 38.87 ± 2.08 % evaluada inmediatamente después de la exposición a la luz ultravioleta, así como del 41.53 ± 2.79 % a los 30 min posteriores y del 47.12 ± 2.12 % a los 60 min posteriores a la luz (N=6, Fig. 26 C). Las pruebas de ANOVA de muestras pareadas y de comparaciones múltiples de Tukey mostraron una diferencia significativa entre la condición control y la actividad post-estímulo, así como en comparación con la actividad 30 min post-estímulo y 60 min post-estímulo ($p < 0.0001$ para las tres condiciones). Este decremento en la actividad inducida posterior a la luz UV no es producido en el grupo control C-57 sin inyección intrabulbar del PAM-FAM inmediatamente después del estímulo fótico (la actividad inducida representa el 91.07 ± 1.21 % de la actividad control), a los 30 min posteriores al mismo (89.09 ± 2.53 % de la actividad control) ni a los 60 min post-estímulo (95.53 ± 62.44 % de la actividad control; ANOVA de muestras pareadas y prueba de comparaciones múltiples de Tukey: $p > 0.05$ para las tres condiciones experimentales; N=6).

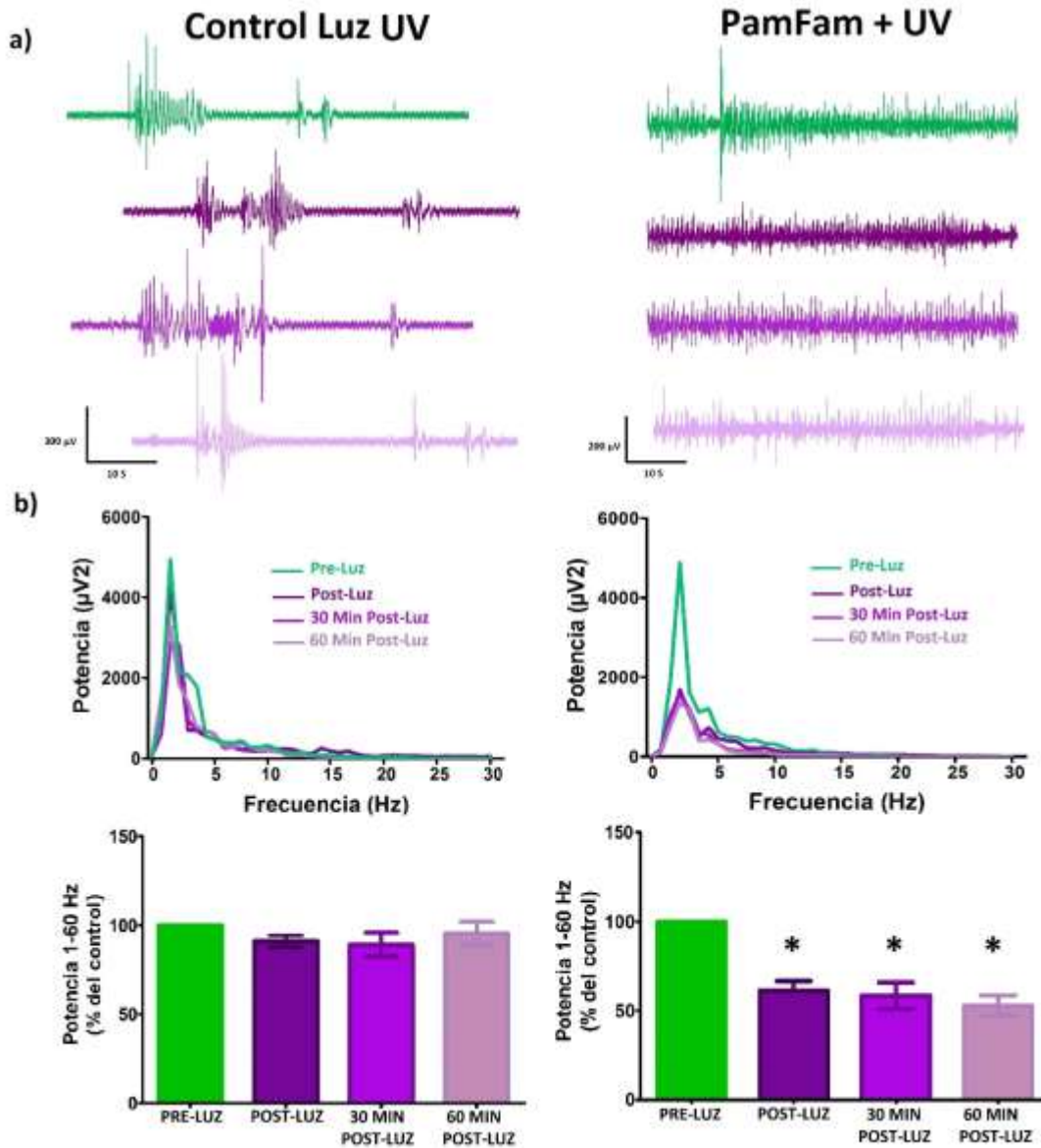


Figura 26.- La activación microglial putativa por el fármaco PAM-FAM disminuye la actividad inducida por esencia de limón en la capa granular del BO en ratones C-57. a) Se muestran trazos representativos del registro electrofisiológico *in vivo* de la actividad inducida por esencia de limón en la capa granular del BO del grupo experimental PAM-FAM intrabulbar y el grupo control sin la inyección. En todos los casos se muestra la actividad en condiciones basales (verde), posterior a la presentación de luz UV (violeta), 30 min post-estímulo (morado claro) y 60 min post-estímulo (morado claro). **b)** Gráficas del espectro de potencia promedio de la condición basal (amarillo), post-estímulo (violeta), 30 min. post-estímulo (magenta) y 60 min. post-estímulo (morado claro). N=6 para ambos grupos. **c)** Cuantificación de la potencia normalizada con respecto al control (tomado como el 100%) para las condiciones del protocolo de registro. Los histogramas representan las medias \pm EEM; los grupos en c) fueron analizados con una ANOVA de muestras pareadas y comparaciones múltiples de Tukey; los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto a la actividad basal ($p < 0.0001$) para el grupo experimental.

La comparación estadística de la actividad inducida por la esencia de limón entre el grupo experimental PAM-FAM (+) y el grupo control mostró una diferencia significativa. La potencia de la actividad inducida por esencia de limón posterior a la presentación de la luz fue cuantificada y normalizada respecto a las condiciones control correspondientes a los dos grupos (la línea punteada representa el 100 % de la potencia cuantificada). Se halló una diferencia significativa entre los dos grupos en la actividad evaluada después de la estimulación a la luz ($p < 0.05$), 30 min posteriores a la estimulación con la luz UV ($p < 0.05$) y 60 min posteriores a la estimulación con la luz ($p < 0.001$) según las pruebas de ANOVA de dos vías y pruebas post-Hoc de Bonferroni; $N = 6$. Figura 27.

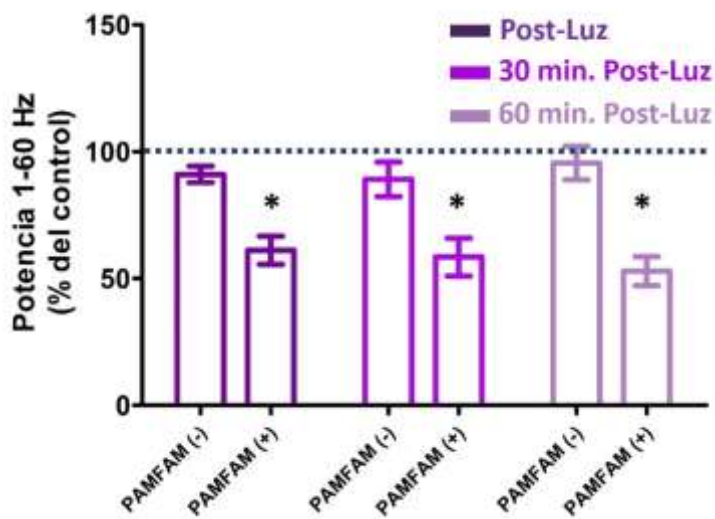


Figura 27.- Comparación del efecto inducido por la estimulación con luz UV en la actividad inducida por esencia de limón en la capa granular del BO de los ratones C57BL/6 inyectados intracranialmente con PAM-FAM y del grupo control. Cuantificación de la potencia normalizada con respecto a la condición control que corresponde a cada grupo (tomada como el 100%). Se incluyen el grupo experimental PAM-FAM (+) y el grupo control PAM-FAM (-) así como las condiciones post-estímulo, 30 min y 60 min. posteriores a la estimulación con luz ultravioleta. Los histogramas representan las medias \pm EEM. Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA de dos vías y comparaciones *post hoc* de Bonferroni; los asteriscos representan una diferencia significativa de la potencia entre el grupo PAM-FAM (+) y el grupo control PAM-FAM (-) al finalizar la estimulación fótica y 30 min post-estimulación ($p < 0.05$), así como 60 min. posteriores a la exposición a la luz ($p < 0.001$).

7.12 Los efectos de la activación microglial mediante la activación optogenética son similares a los efectos de la activación inducida por el lipopéptido PAM-FAM en la potencia de la actividad inducida en la capa granular del BO

Se evaluó si el efecto de la activación de la microglía mediante la activación optogenética presentaba alguna diferencia con el efecto producido por la activación fótica mediante la aplicación de luz ultravioleta en el bulbo olfatorio incubado con el lipopéptido PAM-FAM. La comparación estadística de la potencia de la actividad de la condición experimental (durante la presencia de 20 min de luz azul), cuantificada y normalizada respecto a las condiciones control correspondientes a los dos grupos (Chr2 y PAM-FAM) no arrojó ninguna diferencia significativa en la potencia de la actividad inducida por acetato de amilo, según la prueba de ANOVA de dos vías y prueba de Bonferroni ($p > 0.05$ al finalizar la exposición a la luz, 30 min posteriores a la luz y 60 min posteriores a la luz; $N=6$ para ambos grupos; Figura 28 a). Un efecto similar se mostró según la ANOVA de dos vías y prueba de Bonferroni para evaluar el efecto de la activación microglial en la actividad inducida por esencia de limón ($p > 0.05$, al finalizar la exposición a la luz, 30 min posteriores a la luz y 60 min posteriores a la luz; $N=6$ para ambos grupos, Figura 28 b). Estos resultados indican una similitud en los efectos producidos por ambos tipos de activación microglial.

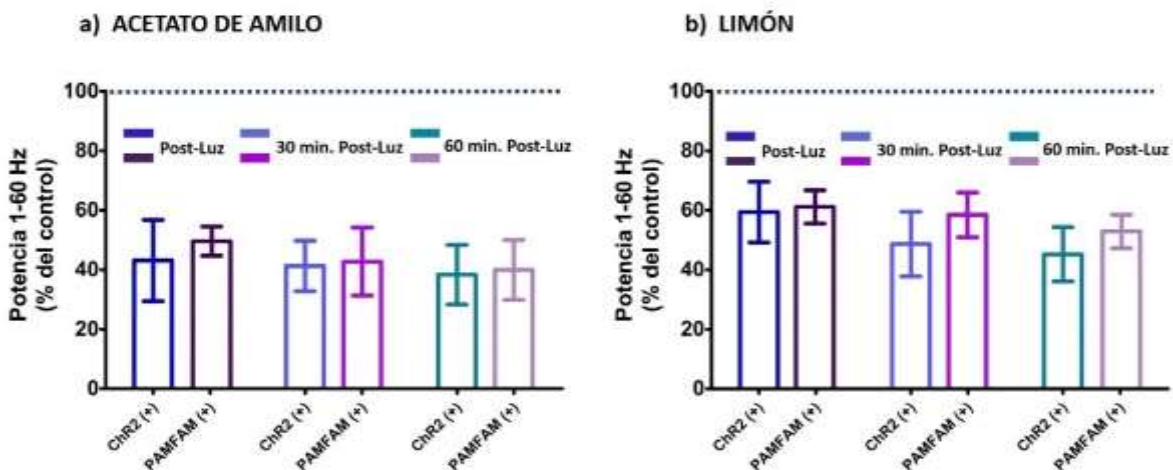


Figura 28.- Resumen del efecto inducido por la activación microglial optogenética y por la activación mediante la estimulación óptica del lipopéptido PAM-FAM. Cuantificación de la potencia normalizada con respecto a la condición basal correspondiente de cada grupo (tomada como el 100% para todos los casos). Los histogramas representan las medias \pm EEM. La prueba ANOVA de dos vías y comparaciones post hoc de Bonferroni no denotaron diferencias significativas entre ambos grupos para la actividad evocada por **a)** acetato de amilo y **b)** esencia de limón natural para las tres condiciones de tiempo post-estimulación fótica. $p > 0.05$.

7.13 La activación optogenética de la microglía disminuye la detección olfatoria

Con el objetivo de caracterizar el efecto de la estimulación con luz azul en los animales transgénicos de la línea cruzada CX3CR1-Cre/Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE que expresaron a la ChR2 en la microglía, se realizó la prueba del alimento enterrado como se describe en materiales y métodos. Para llevar a cabo esta tarea, se realizó previamente el implante de un mini LED de emisión de luz azul mediante una ventana de cráneo rebajado y la fijación del LED con acrílico dental (Ver Figura anexa 1). Después de una semana del procedimiento quirúrgico, 2 grupos de animales se sometieron a la prueba olfatoria. El primer grupo realizó la prueba conductual antes de la presentación de la luz (condición control) y la misma prueba inmediatamente después de la exposición a 20 min de luz azul (N=5). El segundo grupo de animales realizó la prueba en la condición control y la misma prueba una hora después de la presentación de la luz (N=5). Para el primer grupo de animales, la prueba t de student reveló una diferencia significativa entre los puntajes de la prueba obtenidos durante la condición control y la prueba después de la exposición a la luz, con un incremento en el tiempo para encontrar el alimento después de la activación optogenética de la microglía ($p < 0.001$, figura 29 a). De manera similar, una prueba t de student reveló una diferencia significativa entre los puntajes de la prueba durante la condición control y 60 min después de la exposición a la luz, con un incremento en el tiempo para encontrar el alimento después de la activación optogenética de la microglía ($p < 0.05$, Figura 29 b).

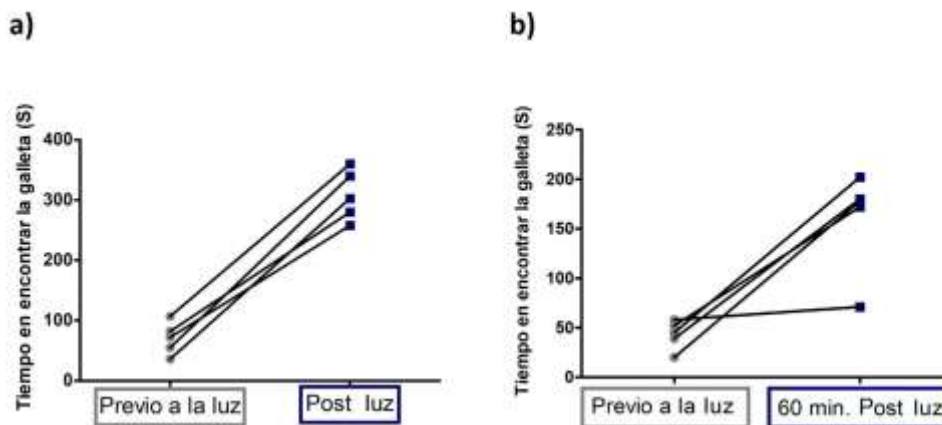


Figura 29.- Efecto de la activación optogenética de la microglía sobre la capacidad olfatoria. a) Tiempo en el que el grupo de animales implantados con un LED de emisión de luz azul encuentra un trozo de galleta enterrada en la condición control (antes de la exposición a la luz azul) e inmediatamente después de la exposición a la luz azul ($p < 0.001$) **b)** Tiempo en el que el grupo de animales implantados con un LED de emisión de luz azul encuentra un trozo de galleta enterrada en la condición control (antes de la exposición a la luz azul) y una hora después de la exposición a la luz azul ($p < 0.05$).

8. Discusión

Tal como fue hipotetizado, nuestros datos mostraron que la activación de la microglía mediante la vía optogenética induce una disminución en la potencia de la actividad del BO de la actividad espontánea en respuesta a la presentación de 20 min de luz continua (Fig. 18). Lo mismo ocurrió en la actividad inducida por acetato de amilo (Fig. 20) y esencia de limón natural (Fig. 22) después de la estimulación fótica. De manera interesante, esta observación correlaciona con una alteración en la detección olfatoria durante las pruebas conductuales (Figura 29). Además, encontramos un efecto similar en la actividad del BO inducida por acetato de amilo y esencia de limón natural (Figura 28) mediante la activación de la microglía a través de la activación del lipopéptido PAM-FAM con luz UV. Lo anterior nos sugiere la microglía modula la función del BO.

8.1 Posibles mecanismos involucrados en la activación optogenética de la microglia

A diferencia de lo que ocurre con los astrocitos (Figueiredo *et al.*, 2011), los intentos de manipulación de la microglía mediante la optogenética son escasos y se han limitado, hasta el momento, la activación de un tipo de ChR2 mutante (ChR2 C128S), ha permitido observar corrientes activadas por luz en microglía de la corteza cerebral (Tanaka *et al.*, 2012). Además, se ha logrado a la expresión del ARNm de citoquinas pro-inflamatorias y de la iNOS debido a la estimulación optogenética de la ChR2 (Swada, 2012).

La ChR2 es un canal para cationes no selectivo que es capaz de permear iones en el orden siguiente: Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y H⁺ (Zhang *et al.*, 2008). Por ello, es probable que la microglía se activa optogenéticamente por el incremento del Ca²⁺ intracelular y/o por el incremento del Na⁺ intracelular. A continuación, se ofrecerá evidencia que apoya ambas posibilidades.

El Ca²⁺ es un ion clave para la modulación microglial que induce respuestas funcionales como la liberación de citoquinas y quimiocinas, así como la respuesta de la microglía a la actividad neuronal (Neary *et al.*, 1996; Hoffmann *et al.*, 2003; Färber & Kettenmann, 2005). Varios moduladores de la microglía son capaces de cambiar las concentraciones de Ca²⁺ intracelular (Verkhatskyand & Kettenmann, 1996; Hide *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2003), entre los que se encuentran los nucleósidos como la adenosina y los nucleótidos como el ATP (Neary *et al.*, 1996) y la uridina trifosfato (UTP, por sus siglas en inglés), que actúan a través de receptores purinérgicos que incrementan el Ca²⁺ intracelular (Hoffmann *et al.*, 2003). La microglía es sensible a los nucleótidos y nucleósidos presentes en el medio extracelular en situaciones de daño (Waltz *et al.*, 1993; Hide *et al.*, 2000). Tales moduladores producen un efecto quimiotáctico que induce la movilización de los procesos de la microgliales y la estimulación de la síntesis de ADN, así como la proliferación de la microglía (Neary *et al.*, 1996; Wake *et al.*, 2013). La adenosina, a través del receptor purinérgico P1 modula la generación de especies reactivas de

oxígenos, así como la proliferación de la microglía (Schubert *et al.*, 1994; Neary *et al.*, 1996).

Las células microgliales son sensibles al ATP debido a que expresan receptores de las familias P2X y P2Y (Waltz *et al.*, 1993), que al ser activados inducen un aumento del Ca^{2+} intracelular (Nörenberg *et al.*, 1994), el cual está relacionado con procesos de activación microglial como la secreción, la fagocitosis y la proliferación (Nörenberg *et al.*, 1994; Hide *et al.*, 2000). La activación microglial mediada por Ca^{2+} genera una variedad de respuestas entre las que se incluye la liberación de más nucleótidos y nucleósidos, generando un proceso de retroalimentación positiva (Neary *et al.*, 1996). Por lo anterior, se dice que los nucleótidos y los nucleósidos podrían fungir como reguladores parácrinos y autócrinos de la microglía (Neary *et al.*, 1996). Hasta el momento se desconoce el mecanismo preciso por el cual el ATP induce, de manera dependiente de Ca^{2+} , la transcripción génica relacionada con la liberación de factores inflamatorios; un mecanismo posible podría ser similar al que se ha propuesto que ocurre en otras células gliales como los astrocitos, en los que el incremento de Ca^{2+} que induce la liberación de ATP que puede conducir a la expresión génica mediante la cascada de las cinasas activadas por mitógeno (MAP kinases, por sus siglas en inglés) (Neary *et al.*, 1994). En el caso de los astrocitos, mediante la activación de los receptores tipo P2Y, el ATP puede disparar la cascada de las MAP kinasas (Neary *et al.*, 1994), las cuales pueden actuar como reguladores funcionales de factores de transcripción tales como Jun y Fos mediante procesos de fosforilación en diversas etapas de la expresión génica (Pulverer *et al.*, 1991; Guille *et al.*, 1992)

Existen otros moduladores importantes de la microglia que modula el Ca^{2+} intracelular entre los que se incluye el LPS (Hoffmann *et al.*, 2003) y los componentes 5 y 3 del complemento (C5a, C53 por sus siglas en inglés) involucrados en respuestas inflamatorias mediante su receptor CD88 (Verkhatskyand & Kettenmann, 1996; Hoffmann *et al.*, 2003). Otro de los moduladores microgliales que modula el Ca^{2+} intracelular es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), el cual induce la activación

de la fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés) que induce el incremento del Ca^{2+} intracelular proveniente de los reservorios intracelulares por la producción de IP3 (Mizoguchi *et al.*, 2009). De esta manera, el BDNF puede llegar a modular procesos inflamatorios (Mizoguchi & Monji, 2017).

Uno de los mediadores de la activación de la microglía a través del Ca^{2+} intracelular es la modulación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B, por sus siglas en inglés) (O'Neill & Kaltschmidt, 1997; Cao *et al.*, 2011). El NF- κ B es un complejo proteico que controla la expresión génica, que es uno de los factores de transcripción más caracterizados en el cerebro (O'Neill & Kaltschmidt, 1997). El NF- κ B es crucial para el funcionamiento de las células gliales e inmunes en las que media la expresión de un amplio rango de genes dentro de los que se encuentran citoquinas de diversos tipos, las enzimas COX e iNOs, inmunorreceptores e interferones (Sparacio *et al.*, 1992; Swingler *et al.*, 1992; Moynagh *et al.*, 1993; Kaltschmidt *et al.*, 1994; Carter *et al.*, 1996; O'Neill & Kaltschmidt, 1997). Por lo tanto, las cascadas bioquímicas del NF- κ B están asociadas con la regulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas, así como la inflamación (Freitas & Fraga, 2018). Además, el Ca^{2+} es un elemento importante que se requiere para la activación de NF- κ B en distintos tipos celulares, incluyendo a las células inmunogénicas (Hsuan *et al.*, 1999; Jefferson *et al.*, 1999; Han & Logsdon, 2000; Tabary *et al.*, 2006).

El NF- κ B está compuesto por 5 subunidades: la Rel A (p65), p50, Rel B, c-rel y p-52, de las cuales, el dímero p50/p65 es el más prominente (Kopp & Ghosh, 1995). En las células no estimuladas, el NF- κ B existe en forma latente, unido a una proteína inhibitoria denominada I κ B (Whiteside & Israel, 1997). Luego de la activación por una amplia gama de agentes extracelulares, la I κ B es fosforilada por un complejo de cinasas de I κ B (IKK, por sus siglas en inglés) (Israel, 2000). Posteriormente, la I κ B es ubiquitinada y degradada por el proteosoma (O'Neill & Kaltschmidt, 1997). La fosforilación del I κ B permite al NF- κ B translocarse al núcleo donde se une a una secuencia consenso κ B que activan la transcripción de genes blanco (Baeuerle & Baltimore, 1996; Lilienbaum & Israel, 2003). Además, el NF- κ B

puede tener un segundo nivel de regulación relativo a la capacidad de transactivación génica que ejerce sobre la subunidad p65 mediante la fosforilación de sus dominios específicos (Wang & Baldwin, 1988; Sakurai *et al.*, 1999).

A pesar de que hay evidencia del requerimiento del Ca^{2+} para la activación del NF- κ B, se desconoce el mecanismo preciso por el cual ocurre esto en diferentes tipos neuronales o gliales. Sin embargo, en 2003 Lilienbaum e Israël propusieron 3 vías de señalización principales que podrían converger en el complejo IKK, como integrador de las señales disparadas por el Ca^{2+} . Los elementos de estas vías tienen como elementos principales a la calmodulina, a las proteínas cinasas C (PKCs, por sus siglas en inglés) y la cascada “Ras/fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K, por sus siglas en inglés)/proteína cinasa B (también llamada Akt)” (Lilienbaum & Israël, 2003). Según esta hipótesis, el último nivel de integración de las señales inducidas por Ca^{2+} es el complejo p50/p65, controlado en dos niveles: la calmodulina/calcineurina, las PKC's y las cinasas o fosfatasas de ras/PI3K/Akt, que dirigen la translocación de NF- κ B desde el citosol a núcleo mediante la modulación del complejo de las IKKs y, como segundo nivel, la transactivación génica que podrían ejercer las subunidades de NF- κ B y que podría ser controlada por la señalización de la calmodulina/CaMKII y de la Akt, de manera paralela (que podría incluir también al complejo IKK como integrador) (Lilienbaum & Israël, 2003). De todas estas vías, se ha encontrado evidencia de la participación de la calmodulina/calcineurina y de las PKC's en la activación de NF- κ B dependiente de Ca^{2+} en linfocitos T (Trushin *et al.*, 1999), un tipo celular que también participa en las respuestas del sistema inmune y que sintetiza factores pro-inflamatorios (Dong *et al.*, 2010).

Se ha reportado previamente la regulación de NF- κ B en la microglía por vías similares a las descritas en el párrafo anterior (Kaltschmidt *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2018). De manera importante, la regulación de NF- κ B ha sido relacionada con la expresión génica de factores involucrados en la formación del ambiente inflamatorio en la microglía, que incluye la producción y liberación del

TNF α , la IL-1 β , la IL-6, la IL-8, la CXCL1 y los interferones tipo I alfa y beta (IFN- α y IFN- β) (Cao *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2017).

Por los antecedentes descritos, es viable la idea de que una vía de señalización común que inicia con el incremento en el Ca²⁺ intracelular microglial pueda converger en la activación de NF- κ B mediante la participación de las cascadas intermediarias de la calmodulina/calcineurina y PKC's, así como del IKK fungiendo como integrador (Lilienbaum & Israël, 2003). Todo lo anterior, podría inducir producción de factores pro-inflamatorios necesarios para el funcionamiento de la microglía (Lilienbaum & Israël, 2003; Cao *et al.*, 2011).

Hasta el momento, se ha relacionado la acción de algunas de las citoquinas y quimiocinas que acompañan la activación de la microglía, tales como IL-1 β , TNF- α , CXCL1 y ROS, con la regulación de la excitabilidad neuronal, por lo cual pueden afectar potencialmente la transmisión sináptica (Stellwagen & Malenka, 2006; Zhang *et al.*, 2014; Vezzani & Viviani, 2015; Werneburg *et al.*, 2017). Por otra parte, uno de los efectos derivados del incremento de Ca²⁺ intracelular en la microglía es la liberación BDNF (Gottmann, 2009). Este factor es capaz de regular la estabilidad sináptica y promover el *pruning* sináptico de la transmisión GABAérgica (Gottmann, 2009). Además, el BDNF liberado por la microglía puede regular la transmisión sináptica mediante la desinhibición de interneuronas inhibitorias (Coull *et al.*, 2005; Ferrini & De Koninck, 2013). De manera consistente con la función del BDNF en la actividad neuronal, se conoce que su liberación en el grupo respiratorio ventral puede modular la actividad respiratoria (Feldman y del Negro, 2006), lo cual se complementa con el dato de la implicación del BDNF en la estimulación de la actividad del complejo pre-Bötzinger que comanda la respiración (Bouvier *et al.*, 2008).

En resumen, dos posibles vías pueden estar involucradas en la modulación de los circuitos neuronales a través de la activación microglial dependiente de Ca²⁺: **1)** el Ca²⁺ intracelular microglial podría inducir varias vías de señalización que conducen a la expresión de genes de factores pro-inflamatorios (Neary *et al.*, 1996). Una vía posible, podría tratarse de la liberación de ATP dentro de un proceso de

retroalimentación positiva que conduce a la liberación de factores pro-inflamatorios (Neary *et al.*, 1996; Hide *et al.*, 2000). Por otra parte, en la activación microglial producida por el incremento del Ca^{2+} intracelular también se involucran las vías de la calmodulina y la PKC, debido a su acción directa sobre factores de transcripción (Trushin *et al.*, 1999; Lilienbaum & Israël, 2003; Liu *et al.*, 2016). Los factores pro-inflamatorios que se liberan por la activación de la microglía dependiente de Ca^{2+} incluyen citoquinas y quimiocinas como la IL-1 β , el TNF- α , el CXCL1 y los ROS que podrían estar potencialmente implicados en la regulación de la excitabilidad neuronal (Vezzani & Viviani, 2015; Werneburg *et al.*, 2017) y **2**) el BDNF liberado por la microglía podría estar implicado en la modulación de la actividad neuronal, debido a su participación en la plasticidad sináptica (Coull *et al.*, 2005; Gottmann, 2009).

De manera adicional, se debe considerar en la activación optogenética de la microglía la posible implicación de las corrientes de Na^+ inducidas por la activación de la ChR2. Como se ha mencionado, esta opsina tiene la mayor permeabilidad a este catión (Zhang *et al.*, 2008). Considerando el antecedente de que la ChR2 es capaz de expresarse en la microglía e inducir un incremento de Na^+ intracelular (Sawada, 2012), mencionaremos los antecedentes que nos permiten sugerir que la activación microglial puede ser potenciada debido a la inducción de corrientes de Na^+ que secundariamente favorecen el incremento del Ca^{2+} intracelular.

La microglía expresa una gran cantidad de receptores y canales iónicos (Eder, 1998). Además de canales de Ca^{2+} , estas células también expresan canales de Cl^- , de K^+ y de H^+ (Eder, 1998; Eder & DeCoursey, 2001; Farber & Kettenmann, 2005), los cuales se han sugerido que tienen una participación importante en el mantenimiento del potencial de membrana microglial, las concentraciones intracelulares iónicas así como en una variedad de funciones como la proliferación, la ramificación, la migración y la secreción de citoquinas y quimiocinas (Eder, 2005). De manera interesante, la microglía también presenta canales de sodio activados por voltaje (VGSC, por sus siglas en inglés) de las isoformas: Nav1.1, Nav1.5 and Nav1.6 (Pappalardo *et al.*, 2016) que participan en la transducción de estímulos

externos o respuestas intracelulares (Craner *et al.*, 2005; Kettenmann *et al.*, 2011; Black & Waxman, 2013). Recientemente, se reportó que la microglía presenta corrientes de Na⁺ que se bloquearon completamente con la Tetrodotoxina (TTX), un bloqueador clásico de canales de Na⁺ (Persson *et al.*, 2014). La participación de los canales de sodio en distintas funciones de la microglía ha sido revelada mediante la utilización de TTX y de fenitoína (bloqueadores de canales de Na⁺ sensibles a voltaje) (Black *et al.*, 2009). Ambos bloqueadores reducen significativamente la actividad fagocítica de la microglía y atenúan la liberación de interleucinas, tales como la IL-1a, la IL-1b y el TNF α provocada por la activación de la microglía mediante la exposición a LPS (Black *et al.*, 2009). De manera similar, ambos bloqueadores producen un decremento en el proceso de migración microglial producido por el ATP (Black *et al.*, 2012), dejando ver la participación de los canales de sodio en la movilización de la microglía en condiciones de daño, un proceso funcional microglial importante (Persson *et al.*, 2014). De esta manera, el bloqueo de los canales de Na⁺ ha permitido revelar la importancia funcional de este ion en las acciones de la microglía como la actividad fagocítica, la liberación de citoquinas y la migración (Black *et al.*, 2012; Persson *et al.*, 2014). Adicionalmente, se ha reportado que el Na⁺ también juega un papel importante en la proliferación de la microglía (Wu *et al.*, 2006).

En relación con lo anterior, se ha sugerido que la alteración de los canales de Na⁺ en la microglía tiene un papel importante en los mecanismos patofisiológicos que subyacen ciertas condiciones patológicas (Kim *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2011). Por ejemplo, se sugiere que, en la Enfermedad de Alzheimer, la sobreactivación de la microglía inducida por la interacción del péptido Beta Amiloide con ciertos VGSC podría incidir en la inducción de un ambiente pro-inflamatorio mediante la liberación alterada de interleucinas, así como alteraciones en la interacción neurona-microglía y cambios en la migración microglial (Catalin *et al.*, 2015). En resumen, la regulación de las funciones gliales mediante canales de Na⁺ tiene implicaciones particulares en la respuesta de la glia activada en el sistema nervioso central tanto en condiciones tanto fisiológicas como patológicas (Catalin *et al.*, 2015; Black & Waxman, 2013; Pappalardo *et al.*, 2016).

Se ha reportado que en condiciones que favorecen la despolarización en la membrana celular de la microglía inducen la activación de VGSC's, induciendo un incremento en el Na⁺ intracelular (Annunziato *et al.*, 2004; Black & Waxman, 2013). De manera crucial, este incremento de Na⁺ es capaz de generar un mecanismo reverso de intercambio entre el Na⁺ y el Ca²⁺ en la bomba intercambiadora NCX (Na⁺/Ca²⁺ exchanger, por sus siglas en inglés) (Ifuku *et al.*, 2007; Kettenmann *et al.*, 2011). La NCX normalmente actúa removiendo el Ca²⁺ de las células y captando Na⁺ debido a su capacidad como proteína membranal antiportera (Yu & Choi, 1997). Gracias a la actividad reversa de esta bomba, el incremento en el Na⁺ intracelular consecuentemente contribuye a la elevación en los niveles de Ca²⁺ dentro de la microglía, lo que cambia la función microglial (Black & Waxman, 2013; Li *et al.*, 2013; Pappalardo *et al.*, 2016). Adicionalmente, también se ha propuesto que los canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ son activados por el influjo de Na⁺ mediante el proceso reverso en la bomba NCX, conduciendo a la hiperpolarización microglial (Ifuku *et al.*, 2007). Finalmente, como una consecuencia de la salida de K⁺ se puede potenciar la capacidad de migración y quimiotaxis en la microglía (Li *et al.*, 2014).

Sobre la base de todo lo que se ha descrito anteriormente, en esta tesis sugerimos dos hipótesis que podrían estar dando lugar a la activación microglial a través de la modulación optogenética controlada por la estimulación de la ChR2. **1)** el incremento en el Ca²⁺ intracelular es capaz de inducir respuestas de la microglía tales como la liberación de factores pro-inflamatorios y de BDNF, resultando en una incidencia sobre la actividad de los circuitos neuronales y **2)** el incremento de Na⁺ intracelular, debido a la mayor preferencia de la ChR2 por este ion, podría potenciar la actividad generada por el Ca²⁺ intracelular. Más adelante describiremos la evidencia que revela la influencia de la liberación de factores pro-inflamatorios en los circuitos neuronales.

8.2 La estimulación óptica de la ChR2 en la microglía induce la alteración de la actividad espontánea e inducida por aromas en el BO, así como una disminución en la capacidad olfatoria

De manera muy interesante, nuestros datos mostraron que la potencia de la actividad del BO sufre una disminución durante la actividad espontánea en respuesta a la presentación de 20 min de luz continua en aquellos animales que expresaron de manera específica la ChR2 en la microglía (Figura 18). Lo mismo ocurre con la potencia de la actividad inducida por acetato de amilo (Figura 20) y por esencia natural de limón (Figura 22). Lo anterior, no sólo sucede inmediatamente después de la exposición a la luz azul sino que se mantiene a los 30 min e incluso a los 60 min después de la estimulación fótica. Esta observación correlaciona con una detección olfatoria alterada en las pruebas conductuales (Figura 29). Desconocemos aún los mecanismos por los cuales la activación de la ChR2 microglial es capaz de inducir esta inhibición robusta en la actividad eléctrica del BO. Sin embargo, más adelante desarrollaremos las premisas mostradas en la literatura que dan lugar a una posible explicación del fenómeno hallado en esta tesis.

Como se mencionó previamente, uno de los efectos asociados al incremento en el Ca^{2+} intracelular en la microglía es la liberación de BDNF (Gottmann, 2009). Nuestros resultados podrían ser explicados por las acciones del BDNF, mismo que regula la función sináptica y el *pruning* sináptico (Gottmann, 2009). El BDNF puede afectar la inhibición mediada por interneuronas (Coull *et al.*, 2005; Gottmann, 2009; Ferrini & De Koninck, 2013), lo que incidiría en una alteración en la actividad inhibitoria, que en caso del BO es comandada globalmente por las células granulares (Fukunaga *et al.*, 2014). Por otra parte, la liberación de factores pro-inflamatorios de las células gliales como la IL-1 β , el TNF- α , la fractalquina (CXCL1), el CXCL6 y los ROS modulan la excitabilidad neuronal y la plasticidad sináptica (Bertollini *et al.*, 2006; Ragozzino *et al.*, 2006; Stellwagen & Malenka, 2006; Maggi

et al., 2009; Lim *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Vezzani & Viviani, 2015; Werneburg *et al.*, 2017).

Algunas de las primeras evidencias que sugieren que el TNF- α liberado por la microglía podría modular las funciones sinápticas se basan en que el TNF- α regula la cantidad de receptores AMPA, la fuerza sináptica y la plasticidad homeostática (Beattie, *et al.*, 2002; Stellwagen *et al.*, 2005; Stellwagen & Malenka, 2006; Lewitus *et al.*, 2016).

La CXCL1, el ligando natural del receptor CX3CR1 y el cual se encuentra ampliamente expresado en las membranas neuronales (Werneburg *et al.*, 2017), es capaz de afectar función sináptica disminuyendo la transmisión glutamatérgica (Bertollini *et al.*, 2006; Ragozzino *et al.*, 2006) y alterando la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) (Maggi *et al.*, 2009); de manera similar a la quimiocina CXCL6 que está implicada en la regulación de la transmisión glutamatérgica y GABAérgica (Di Castro *et al.*, 2016). Lo mismo fue encontrado para la IL-1 β , la cual también es capaz de alterar la LTP, (Ross *et al.*, 2003; Goshen *et al.*, 2007; Werneburg *et al.*, 2017). Adicionalmente, la IL-1 β y la IL-6, así como el ya mencionado TNF- α , modulan receptores ionotrópicos, así como de receptores dependientes de ligando; por lo que una excesiva liberación de factores pro-inflamatorios podría conducir a una alteración tanto en la transmisión glutamatérgica como en la GABAérgica (Vezzani & Viviani, 2015).

Estos datos sustentan sólidamente la hipótesis de que la activación microglial que resulta en la liberación de mediadores inflamatorios podría tener una severa influencia en la dinámica de los circuitos neuronales y, consecuentemente, en el comportamiento. Por tanto, esto es consistente con lo que ocurre a nivel de la función olfatoria, ya que la sobre-activación de la microglía es capaz de generar deficiencias olfatorias dependientes de un probable ambiente inflamatorio (Lalancette-Hébert *et al.*, 2009; Berti *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2014).

De manera integral, las dos hipótesis planteadas que relacionan el incremento en la liberación de BDNF y de factores pro-inflamatorios dependiente de una actividad sinérgica generada a partir de la posible señalización inducida por el incremento intracelular de los iones de Ca^{2+} y Na^{+} en la microglía gracias a la activación de la ChR2, podrían explicar los cambios encontrados a nivel del circuito bulbar en la capa granular del BO tanto en la actividad basal como en la actividad inducida por aromas, lo que en términos finales podría conducir a una alteración en la capacidad olfatoria.

8.3 Efecto de la estimulación optogenética en comparación con la estimulación farmacológica mediante la activación del PAM-FAM en la microglía del BO

Nuestros resultados mostraron que la activación de la microglía mediante la activación optogenética o la activación fótica mediante luz UV del lipopéptido PAM-FAM produce efectos muy similares en la actividad del BO inducida por acetato de amilo y esencia de limón natural (Figura 28).

Es concebible la idea de que el efecto provocado por la activación microglial farmacológica mediante la activación del PAM-FAM se deba a mecanismos de inducción de un ambiente pro-inflamatorio similar.

Como se describió anteriormente, los fármacos PAM-FAM y MALP-2 son ejemplos de agonistas sintéticos del complejo receptor TLR2/TLR6 presente en las células microgliales (Wang *et al.*, 2013). Casi todos los TLRs, comparten una vía de señalización común dependiente de MyD88 (molécula adaptadora) y TIRAP (dominio del TLR) (Takeda & Akira, 2004; Kawai & Akira, 2010). Dos de las tres cadenas lipídicas del lipopéptido triacetilado de las bacterias interactúan con TLR2 lo que induce la activación del complejo TLR2/TLR6 y el reclutamiento de MyD88 y TIRAP, esto conduce a la activación de NF- κ B (Kawai & Akira, 2010). Gracias a este mecanismo, se inicia la transcripción de genes de las citocinas involucradas en la formación del ambiente pro-inflamatorio provocado por la activación del complejo

TLR2/6; tales citocinas han sido reportadas en la literatura como TNF α , la IL-1 β , la IL-6, la IL-8, la CXCL1 y los interferones tipo I alfa y beta (IFN- α y IFN- β) (Medzhitov, 2001; Tseng *et al.*, 2010). Prototípicamente, la inducción de las citocinas pro-inflamatorias está mediada por (NF-kB) (Li & Verma, 2002), mientras que la transcripción de IFN-I es inducida mediante la activación de los factores de transcripción reguladores de interfeferón (IRF, por sus siglas en inglés) (Honda & Taniguchi, 2006).

Con base en el mecanismo de acción de la activación microglial mediante el complejo TLR2/6 (Kawai & Akira, 2010), que finaliza en la liberación de factores pro-inflamatorios y dado el antecedente de la influencia de éstos sobre la excitabilidad neuronal (Vezzani & Viviani, 2015; Werneburg *et al.*, 2017), podemos sugerir que las alteraciones en la actividad inducida por aromas en el BO tanto con acetato de amilo (Fig. 24) y limón (Fig. 26), posterior a la aplicación de PAM-FAM, podría ser el resultado de estos mediadores pro-inflamatorios que se producen al activar a la microglía. Además, esta disminución en la actividad inducida por aromas debido a la activación del PAM-FAM también se encuentra mediante la estimulación optogenética (Fig. 20 y Fig. 22) y no parece tener diferencias (Fig. 28), apuntando aún más a la probable acción de los factores pro-inflamatorios dependientes de la actividad de la microglía.

9. Conclusión

La activación optogenética de la microglía disminuye la potencia de la actividad oscilatoria espontánea de la capa granular del BO, así como el incremento en la potencia de la actividad inducida en la capa granular del BO por la exposición al acetato de amilo y esencia de limón natural.

La activación farmacológica de la microglía mediante la activación del PAM-FAM disminuye el incremento en la potencia de la actividad inducida en la capa granular del BO por la exposición a acetato de amilo y esencia de limón natural, de manera similar a la que ocurre con la activación optogenética.

La activación optogenética de la microglía en el BO disminuye la capacidad olfatoria. Estos datos sugieren la activación microglía altera la función olfatoria debido al decremento de la actividad del BO.

10. Bibliografía

- Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*; 450: 420–424.
- Adrian ED (1942) Olfactory reactions in the brain of the hedgehog. *J Physiol*; 100: 459-473.
- Aloisi F (2001) Immune function of microglia. *Glia*; 36(2): 165-79.
- Altman, J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*; 137 (4): 433-58.
- Alvarado-Martínez R, Salgado-Puga K, Peña-Ortega F (2013) Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell. *PLoS One*;8(9):e75745.
- Annunziato L, Pignataro G, Di Renzo GF (2004) Pharmacology of brain Na⁺/ Ca²⁺ exchanger: From molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacol Rev*; 56:633–654.
- Araneda R, Kini A, Firestein S (2000) The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nat Neurosci*; 3: 1248-1255.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri R, Haydon PG (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*; 22: 208–215.
- Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, Feliciano C, Deisseroth K, Augustine GJ, Ehlers MD, Feng G (2007) In vivo light induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron*; 54(2): 205-18.
- Arevian AC, Kapoor V, Urban NN (2008) Activity-dependent gating of lateral inhibition in the mouse olfactory bulb. *Nat Neurosci*; 11: 80-87.
- Atasoy D, Aponte Y, Hong SH, Sternson SM (2008) A FLEX switch targets Channelrhodopsin-2 to multiple cell types for imaging and long-range circuit mapping. *Neurosci*; 28(28): 7025–7030.

- Bamann C, Gueta R, Kleinlogel S, Nagel G, Bamberg E (2010) Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond. *Biochemistry*; 49(2): 267-78.
- Baeuerle PA, Baltimore D (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell*; 87(1):13-20.
- Bardy C, Alonso M, Bouthour W, Lledo PM (2010) How, when, and where new inhibitory neurons release neurotransmitters in the adult olfactory bulb. *J Neurosci*; 30: 17023–17034.
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC (2002) Control of synaptic strength by glial TNF alpha. *Science*; 295:2282-2285.
- Bekkers JM, Suzuki N (2013) Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex. *Trends Neurosci*; 36(7): 429-438.
- Bertollini C, Ragozzino D, Gross C, Limatola C, Eusebi F (2006) Fractalkine/CX3CL1 depresses central synaptic transmission in mouse hippocampal slices. *Neuropharmacology*; 51:816-821.
- Bertrand JY1, Jalil A, Klaine M, Jung S, Cumano A, Godin I (2005) Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood*; 106(9):3004-11.
- Bessis, Béchade C, Bernard D, Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*; 55: 233–238.
- Bilbo, Levkoff LH, Mahoney JH, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF (2005) Neonatal infection induces memory impairments following an immune challenge in adulthood. *Behav. Neurosci.*; 119: 293–301.
- Black JA, Liu S, Waxman SG (2009) Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia*; 1;57(10):1072-81.
- Black JA, Waxman SG (2011) Sodium channels and microglial function. *Exp Neurol*; 234(2):302-15.
- Black JA, Waxman SG (2013) Noncanonical Roles of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*; 80(2):280-91
- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*; 8(1):57-69.

- Boddeke EW, Meigel I, Frentzel S, Gourmala NG, Harrison JK, Buttini M, Spleiss O, Gebicke-Harter P (1999) Cultured rat microglia express functional beta-chemokine receptors. *J Neuroimmunol*; 98:176–184.
- Bouvier J, Autran S, Dehorter N, Katz DM, Champagnat J, Fortin G, Thoby-Brisson M (2008) Brain-derived neurotrophic factor enhances fetal respiratory rhythm frequency in the mouse preBötzing complex in vitro. *Eur J Neurosci*; 28(3):510-20.
- Boyd AM, Sturgill JF, Poo C, Isaacson JS (2012) Cortical feedback control of olfactory bulb circuits. *Neuron*; 76(6): 1161-74.
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*; 8(9): 1263-8.
- Boyden ES (2011) Optogenetics: using light to control the brain. *Cerebrum*; 2011: 16.
- Bozza T, Feinstein P, Zheng C, Mombaerts P (2002) Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *J Neurosci*; 22: 3033-3043.
- Bozza T, McGann J, Mombaerts P, Wachowiak M (2004) In vivo imaging of neuronal activity by targeted expression of a genetically encoded probe in the mouse. *Neuron*; 42: 9-21.
- Brown JT, Chin J, Leiser SC, Pangalos MN, Randall AD (2011) Altered intrinsic neuronal excitability and reduced Na⁺ currents in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*; 32(11):2109.e1–2109.e14.
- Buskamp V, Duebel J, Balya D, Fradot M, Viney TJ, Siegert S, Groner AC, Cabuy E, Forster V, Seeliger M, Biel M, Humphries P, Paques M, Mohand-Said S, Trono D, Deisseroth K, Sahel JA, Picaud S, Roska B (2010) Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science*; 329: 413–417.
- Buskamp V, Roska B. (2011) Optogenetic approaches to restoring visual function in retinitis pigmentosa. *Curr Opin Neurobiol*; 21: 942–946.

- Buszáki G, Chrobak J (1995). Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Curr Opin Neurobiol*; 5: 504-510.
- Buzsáki G (2002) Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron*; 33: 325-340.
- Buzsáki G, Draguhn A (2004) Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*; 304 (5679): 1926-1929.
- Buzsáki G (2006) Rhythms of the brain. New York, NY. Oxford University Press.
- Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C (2012) The origin of extracellular fields and currents EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci*; 13 (6): 407-420.
- Buzsáki G, Moser E (2013) Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci*; 16(2): 130-8.
- Cao Q, Kaur C, Wu CY, Lu J, Ling EA (2011) Nuclear factor-kappa β regulates Notch signaling in production of proinflammatory cytokines and nitric oxide in murine BV-2 microglial cells. *Neuroscience*; 192:140-54.
- Cao Q, Karthikeyan A, Dheen ST, Kaur C, Ling EA (2017) Production of proinflammatory mediators in activated microglia is synergistically regulated by Notch-1, glycogen synthase kinase (GSK-3 β) and NF- κ B/p65 signalling. *PLoS One*;12(10):e0186764.
- Cardin JA, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai LH, Moore CI (2009) Driving fast-spiking cells induces γ rhythm and controls sensory responses. *Nature*; 459: 663–667.
- Carpenter MB (1994) Neuroanatomía. Fundamentos. Madrid, ES. Editorial Panamericana.
- Cătălin B, Mitran S, Ciorbagiu M, Osiac E, Bălşeanu TA, Mogoantă L, Dinescu SN, Albu CV, Mirea CS, Vîlcea ID, Iancău M, Sfredel V (2015) Microglial voltage-gated sodium channels modulate cellular response in Alzheimer's disease-a new perspective on an old problem. *Rom J Morphol Embryol*; 56(1):21-5.
- Chan RC, Shum D, Touloupoulou T, Chen EY. (2008) Assessment of executive functions: review of instruments and identification of critical issues. *Arch Clin Neuropsychol*; 23(18): 7107-7116.

- Chen WR, Shepherd GM (2005) The olfactory glomerulus: a cortical module with specific functions. *J Neurocytol*; 34: 353-360.
- Chen Z, Jalabi W, Shpargel KB, Farabaugh KT, Dutta R, Yin X, Kidd GJ, Bergmann CC, Stohlman SA, Trapp BD (2012) Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci*; 22, 32(34):11706-15.
- Chen Q, Zeng Z, Hu Z (2012) Optogenetics in neuroscience: what we gain from studies in mammals. *Neurosci Bull*; 28(4): 423-34.
- Christie JM, Schoppa NE, Westbrook GL (2001) Tufted cell dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is dependent on NMDA receptor activity. *J Neurophysiol.*; 85: 169–173.
- Cleland TA, Sethupathy P (2006). Non-topographical contrast enhancement in the olfactory bulb. *BMC Neurosci*; 7: 7.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*; 438:1017-1021.
- Crossman AR, Neary D (2007) Neuroanatomía: Texto y Atlas en Color. Edit. Masson-Elsevier.
- Curry JL, Qin JZ, Bonish B, Carrick R, Bacon P, Panella J, Robinson J, Nickoloff BJ (2005) Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102(27): 9577-82.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATPmediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*; 8:752–8.
- Davis EJ, Foster TD, Thomas WE (1994) Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull*; 34(1):73-8.
- Derecki NC, Cronk JC, Lu Z, Xu E, Abbott SB, Guyenet PG, Kipnis J (2012) Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature*; 484: 105–109.

- Dhawale AK, Hagiwara A, Bhalla US, Murthy VN, Albeanu DF (2010). Non-redundant odor coding by sister mitral cells revealed by light addressable glomeruli in the mouse. *Nat Neurosci*; 13(11): 1404-1412.
- Deisseroth K (2011) Optogenetics. *Nat Methods*; 8(1): 26-29.
- Dheen ST, Kaur C, Ling EA (2007) Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem.*; 14(11):1189-97.
- Del Rio Hortega P (1919) El 'tercer elemento' de los centros nerviosos. Poder fagocitario y movilidad de la microglia. *Bol Soc Esp Biol Ano*; 9:154–166.
- DeMaria S, Ngai J (2010) The cell biology of smell. *J Cell Biol*; 19(3): 443–452.
- Denizet M, Cotter L, Lledo PM, Lazarini F (2016) Sensory deprivation increases phagocytosis of adult-born neurons by activated microglia in the olfactory bulb. *Brain Behav Immun*; S0889-1591(16): 30424-X.
- Di Castro MA, Trettel F, Milior G, Maggi L, Ragozzino D, Limatola C (2016) The chemokine CXCL16 modulates neurotransmitter release in hippocampal CA1 area. *Sci Rep*; 6:34633.
- Dickson DW, Lee SC, Mattiace LA, Yen SH, Brosnan C (1993) Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia*; 7(1):75-83.
- Dissing-Olesen L, LeDue JM, Rungta RL, Hefendehl JK, Choi HB, MacVicar BA (2014) Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial process outgrowth. *J Neurosci*; 34(32):10511-27.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*; 17(13):5046-61.
- Dong C, Martinez GJ (2010) «T cells: the usual subsets» [Células T: los subtipos comunes] (en inglés). Houston, Texas: Nature Publishing Group.
- Doorn KJ, Brevé JJ, Drukarch B, Boddeke HW, Huitinga I, Lucassen PJ, van Dam AM (2015) Brain region-specific gene expression profiles in freshly isolated rat microglia. *Front Cell Neurosci*; 9:84.
- Doty RL (2012) Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*; 8: (6) 329–339.

- Eeckman FH, Freeman WJ (1990) Correlations between unit firing and EEG in the rat olfactory system. *Brain Res*; 528:238–244.
- Ennis M, Hayar A (2008) Physiology of the main olfactory bulb , in "The Senses: A Comprehensive Reference". Vol 4: Olfaction and Taste, eds S Firestein and K Beauchamp (San Diego, CA: Academic Press), 641-686. Färber K, Kettenmann H (2005) Physiology of microglial cells. *Brain Res Brain Res Rev*; 48(2):133-43.
- Erblich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW (2011) Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLoS One*; 6(10):e26317.
- Feldman JL, Del Negro CA (2006) Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci*; 7(3):232-42.
- Ferrini F, De Koninck Y (2013) Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. *Neural Plast*; 429815.
- Figueiredo M, Lane S, Tang F, Liu BH, Hewinson J, Marina N, Kasymov V, Souslova EA, Chudakov DM, Gourine AV, Teschemacher AG, Kasparov S (2011) Optogenetic experimentation on astrocytes. *Exp Physiol*; 96(1):40-50.
- Firestein S (2001) How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*; 413(6852):211-8.
- Flowers JM, Hazzouri KM, Pham GM, Rosas U, Bahmani T, Khraiwesh B, Nelson DR, Jijakli K, Abdrabu R, Harris EH, Lefebvre PA, Hom EF, Salehi-Ashtiani K, Purugganan MD (2015) Whole-Genome Resequencing Reveals Extensive Natural Variation in the Model Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*; 27(9):2353-69.
- Fukunaga I, Herb JT, Kollo M, Boyden ES, Schaefer AT (2014) Independent control of gamma and theta activity by distinct interneuron networks in the olfactory bulb. *Nat Neurosci*; 17(9): 1208-1216.
- Fourcaud-Trocme N, Courtiol E, Buonviso N (2014) Two distinct olfactory bulb sublamina networks involved in gamma and beta oscillation generation: a CSD study in the anesthetized rat. *Front Neural Circuits*; 8: 88.

- Freitas RHCN, Fraga (2018) CAM NF-KB-IKK β pathway as a target for drug development: realities, challenges and perspectives. *Curr Drug Targets*.
- Freund TF, Buzsáki G (1966) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*; 6: 347–470.
- Friedman D, Strowbridge BW (2003) Both electrical and chemical synapses mediate fast network oscillations in the olfactory bulb. *J Neurophysiol*; 89: 2601-2610.
- Frost JL, Schafer DP (2016) Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends Cell Biol*; 26(8): 587-97.
- Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW (1995) Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev*;20(3):269-87.
- Gille H1, Sharrocks AD, Shaw PE 1992) Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature*; 358(6385):414-7.
- Ginhoux F, Prinz M (2015) Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 7(8):a020537.
- Goshen I, Kreisel T, Ounallah-Saad H, Renbaum P, Zalstein Y, Ben-Hur T, Levy-Lahad E, Yirmiya R (2007) A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology*; 32:1106-1115.
- Gottmann K, Mittmann T, Lessmann V (2009) BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. *Exp Brain Res*; 199:203-234.
- Grier BD, Belluscio L, Cheetham CE (2015) Olfactory Sensory Activity Modulates Microglial-Neuronal Interactions during Dopaminergic Cell Loss in the Olfactory Bulb. *Front Cell Neurosci*; 10:178.
- Gschwend O, Abraham NM, Lagier S, Begnaud F, Rodriguez I, Carleton A (2015) Neuronal pattern separation in the olfactory bulb improves odor discrimination learning. *Nat Neurosci*; 18(10): 1474-82.
- Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG, Spyer KM, Deisseroth K, Kasparov S (2010) Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science*; 329(5991): 571–575.

- Grosenick L, Marshel JH, Deisseroth K (2015) Closed-Loop and Activity-Guided Optogenetic Control. *Neuron*; 86(1): 106-139.
- Haines DE (2006) Principios de Neurociencia. Madrid, ES. Elsevier Science.
- Han B, Logsdon CD (2000) CCK stimulates mob-1 expression and NF-kB activation via protein kinase C and intracellular Ca²⁺. *Am J Physiol Cell Physiol*; 278:C344–C351.
- Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*; 40:140–155
- Hanisch UK, Kettenmann, H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*; 10: 1387–1394.
- Harris JA, West AK, Chuah MI (2009) Olfactory ensheathing cells: Nitric oxide production and innate immunity. *Glia*; 57:1848–1857.
- Harper RM (2000) Sudden infant death syndrome: a failure of compensatory cerebellar mechanisms?. *Pediatr Res*; 48:140-2.
- Hawkes C, Doty RL (2009) The neurology of olfaction. Cambridge, UK. Cambridge Univ. Press.
- Hernández-Soto R (2015) Cambios en la actividad eléctrica bulbar in vivo inducidos por el enriquecimiento olfatorio. (Disertación de tesis de Licenciatura) UNAM, Qro.
- Hewitt P (2004) Física Conceptual (Novena edición). PEARSON EDUCACIÓN. «28». p. 544.
- Hide I, Tanaka M, Inoue A, Nakajima K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y (2000) Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J Neurochem*; 75(3):965-72.
- Hino H, Miles NG, Bando H, Ueda H (2009) Molecular biological research on olfactory chemoreception in fishes. *J Fish Biol*; 75(5):945-59.
- Hoffmann A, Kann O, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kettenmann H (2003) Elevation of basal intracellular calcium as a central element in the activation of brain macrophages (microglia): suppression of receptor-evoked calcium signaling and control of release function. *J Neurosci*; 23(11):4410-9.
- Hoffman J, Aslimovska L, Bamann C, Glaubitz C, Bamerg E, Brutschy B (2010) Studying the stoichiometries of membrane proteins by mass spectrometry:

- microbial rhodopsins and a potassium ion channel. *Phys Chem*; 12: 3480-3485.
- Holness CL, Simmons DL (1993) Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*; 81:1607–1613.
- Honda K, Taniguchi T (2006) IRFs: master regulators of signaling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*; 6: 644–658.
- Hsuan SL, Kannan MS, Jeyaseelan S, Prakash YS, Malazdrewich C, Abrahamsen MS, Sieck GC, Maheswaran SK (1999) Pasteurella haemolytica leukotoxin and endotoxin induced cytokine gene expression in bovine alveolar macrophages requires NF- κ B activation and calcium elevation. *Microb Pathog*; 26:263–273.
- Hu H, Vervaeke K, Storm JF (2002) Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na⁺ current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*; 545:783–805.
- Huang L, Garcia I, Jen HI, Arenkiel BR (2013) Reciprocal connectivity between mitral cells and external plexiform layer interneurons in the mouse olfactory bulb. *Front Neural Circuits*; 7: 32.
- Hutcheon B, Yarom Y (2000) Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends Neurosci*; 23(5): 216-22.
- Ifuku M, Färber K, Okuno Y, Yamakawa Y, Miyamoto T, Nolte C, Merrino VF, Kita S, Iwamoto T, Komuro I, Wang B, Cheung G, Ishikawa E, Ooboshi H, Bader M, Wada K, Kettenmann H, Noda M (2007) Bradykinin-induced microglial migration mediated by B1-bradykinin receptors depends on Ca²⁺ influx via reverse-mode activity of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci*; 27(48): 13065–13073.
- Igarashi KM, Ieki N, An M, Yamaguchi Y, Nagayama S, Kobayakawa K (2012) Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. *J Neurosci*; 32:7970–85.
- Imai T (2014) Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol*; 35: 180-8.

- Isaacson JS, Vitten H (2003) GABAB receptors inhibit dendrodendritic transmission in the rat olfactory bulb. *J Neurosci*; 23: 2032–2039.
- I Israël A (2000) The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- κ B? *Trends Cell Biol*; 10:129–133.
- Jefferson KK, MF Smith Jr. Bobak DA (1999) Roles of intracellular calcium and NF- κ B in the Clostridium difficile toxin A-induced upregulation and secretion of IL-8 from human monocytes. *J Immunol*; 163: 5183–5191.
- Jung GY, Lee JY, Rhim H, Oh TH, Yune TY (2013) An increase in voltage-gated sodium channel current elicits microglial activation followed inflammatory responses in vitro and in vivo after spinal cord injury. *Glia*; 61(11):1807-21.
- Kaltschmidt C1, Kaltschmidt B, Lannes-Vieira J, Kreutzberg GW, Wekerle H, Baeuerle PA, Gehrmann (1994) Transcription factor NF-kappa B is activated in microglia during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*; 55(1): 99-106.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Agud A, JL (2001) Principios de neurociencia. Madrid, ES. McGraw-Hill Interamericana de Espa. a.
- Kato HE, Zhang F, Yizhar O, Ramakrishnan C, Nishizawa T, Hirata K, Ito J, Aita Y, Tsukazaki T, Hayashi S, Hegemann P, Maturana AD, Ishitani R, Deisseroth K, Nureki O (2012) Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature*; 482(7385): 369-74.
- Kay LM (2005) Theta oscillations and sensorimotor performance. *Proc Natl Acad Sci*; 102(10): 3863-3868.
- Kay LM, Beshel J, Brea J, Martin C, Rojas-Líbano D, Kopell N (2009) Olfactory oscillations: the what, how and what for. *Trends Neurosci*; 32: 207–214.
- Kay LM (2015) Olfactory system oscillations across phyla. *Curr Opin Neurobiol*; 31: 141-7.
- Kettenmann H, Hanisch U K, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev*; 91: 461–553.
- Kiernan JA (2001) Barr El Sistema Nervioso Humano: Una Perspectiva Anatómica. Baltimore, MD. Lippincott Williams And Wilkins, Wolters Kluwer Health.

- Kim SU, de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res*; 81(3): 302-13.
- Kim S, Jeon TJ, Oberai A, Yang D, Schmidt JJ, Bowie JU (2005) Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102(40):14278–14283.
- Kirsten TB, Chaves GP, Taricano M, Martins DO, Flório JC, Britto LR, Torrão AS, Palermo-Neto J, Bernardi MM (2011) Prenatal LPS exposure reduces olfactory perception in neonatal and adult rats. *Physiol Behav*; 104(3):417-22.
- Kopp EB, Ghosh S (1995) NF- κ B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol*; 58:1–27.
- Kosaka K, Kosaka T (2007) Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb. *Brain Res*; 1167: 42–55.
- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*; 466: 622–626.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*; 19(8): 312-8.
- Lagier S, Carleton A, Lledo PM (2004) Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates gamma oscillations in the rat olfactory bulb. *J Neurosci*; 24: 4382–4392.
- Lalancette-Hébert MI, Moquin A, Choi AO, Kriz J, Maysinger D (2009) Lipopolysaccharide-QD micelles induce marked induction of TLR2 and lipid droplet accumulation in olfactory bulb microglia. *Mol Pharm*; 7:1183–1194.
- Lazarini F, Gabellec MM, Torquet N, Lledo PM (2012) Early activation of microglia triggers long-lasting impairment of adult neurogenesis in the olfactory bulb. *J Neurosci*; 32: 3652–3664.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*; 39: 151–170.

- Lewitus GM, Konefal SC, Greenhalgh AD, Pribiag H, Augereau K, Stellwagen D (2016) Microglial TNF- α suppresses cocaine- induced plasticity and behavioral sensitization. *Neuron*; 90:483-491.
- Leung LS, Yu HW (1998) Theta-frequency resonance in hippocampal CA1 neurons in vitro demonstrated by sinusoidal current injection. *J Neurophysiol*; 79: 1592–1596.
- Lepousez G, Lledo PM (2013) Odor Discrimination Requires Proper Olfactory Fast Oscillations in Awake Mice. *Neuron*; 80(4): 1010-1024.
- Li Q, Verma IM (2002) NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*; 2: 725–734.
- Li A, Gire DH, Bozza T, Restrepo D (2014) Precise detection of direct glomerular input duration by the olfactory bulb. *J Neurosci*; 34(48): 16058-16064.
- Li BW, Gou M, Xiao R, Li QW (2015) [Voltage-gated sodium channels are involved in regulating the biological functions of microglial cells]. *Sheng Li Xue Bao* [Article in Chinese]; 67(1):41-7.
- Lilienbaum A, Israël (2003) From calcium to NF- κ B signaling pathways in neurons. *Mol Cell Biol*; 23(8):2680-98.
- Lim SH, Park E, You B, Jung Y, Park AR, Park SG, Lee JR (2013) Neuronal synapse formation induced by microglia and interleukin 10. *PLoS One*; 8:e81218.
- Lim DA, Álvarez-Buylla A (2016) The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 8(5):a018820.
- Lima SQ, Miesenbock G (2005) Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons. *Cell*; 121(1): 141-152.
- Lin JY (2001) A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Exp Physiol*; 96(1):19-25.
- Liu X, Wang N, Zhu Y, Yang Y, Chen X, Fan S, Chen Q, Zhou H, Zheng J (2016) Inhibition of Extracellular Calcium Influx Results in Enhanced IL-12 Production in LPS-Treated Murine Macrophages by Downregulation of the CaMKK β -AMPK-SIRT1 Signaling Pathway. *Mediators Inflamm*; 2016:6152713.

- Lois C, Álvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*; 264:1145-1148.
- Lorea-Hernández JJ, Morales T, Rivera-Angulo AJ, Alcantara-Gonzalez D, Peña-Ortega F (2015) Microglia modulate respiratory rhythm generation and autoresuscitation. *Glia*; 64(4):603-19.
- Lorier AR, Lipski J, Housley GD, Greer JJ, Funk GD (2008) ATP sensitivity of preBötzing complex neurones in neonatal rat in vitro: mechanism underlying a P2 receptor-mediated increase in inspiratory frequency. *J Physiol*; 586(5):1429-46.
- Lu VB, Biggs JE, Stebbing MJ, Balasubramanyan S, Todd KG, Lai AY, Colmers WF, Dawbarn D, Ballanyi K, Smith PA (2009) Brain-derived neurotrophic factor drives the changes in excitatory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn that follow sciatic nerve injury. *J Physiol*; 587(Pt 5):1013-32.
- Madisen L, Mao T, Koch H, Zhuo JM, Berenyi A, Fujisawa S, Hsu YW, Garcia AJ, Gu X, Zanella S, Kidney J, Gu H, Mao Y, Hooks BM, Boyden ES, Buzsaki G, Ramirez JM, Jones AR, Svoboda K, Han X, Turner EE, Zeng H (2012) A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat Neurosci*; 15(5):793-802.
- Maggi L, Trettel F, Scianni M, Bertollini C, Eusebi F, Fredholm BB, Limatola C (2009) LTP impairment by fractalkine/CX3CL1 in mouse hippocampus is mediated through the activity of adenosine receptor type 3 (A3R). *J Neuroimmunol*; 215:36-42
- Magistretti PJ (2006). Neuron–glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol*; 209: 2304–2311.
- Markopoulos F, Rokni D, Gire DH, Murthy VN (2012) Functional properties of cortical feedback projections to the olfactory bulb. *Neuron*; 76(6): 1175-88.
- Martin C, Ravel N (2014) Beta and gamma oscillatory activities associated with olfactory memory tasks: different rhythms for different functional networks?. *Front Behav Neurosci*; 8: 218.
- Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*; 1(2):135-45.

- McGeer PL, McGeer EG (2008) Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord*; 23(4): 474-83.
- McQuiston AR, Katz L (2001) Electrophysiology of Interneurons in the Glomerular Layer of the Rat Olfactory Bulb. *J Neurophysiol*; 86: 1899-1907, 2001.
- McKeown DA, Doty RL, Perl PD, Frye RE, Simms I, Mester A (1996) Olfactory function in young adolescents with Down's syndrome. *J Neurol Neurochir Psychiatr*, 61 (4): 412–414.
- Miyamichi K, Serizawa S, Kimura NM (2005) Deficits in sexual and aggressive behaviors in Cnga2 mutant mice. *Nat Neurosci*; 8: 1660-1662.
- Mizoguchi Y, Monji A, Kato T, Seki Y, Gotoh L, Horikawa H, Suzuki SO, Iwaki T, Yonaha M, Hashioka S, Kanba S (2009) Brain-derived neurotrophic factor induces sustained elevation of intracellular Ca²⁺ in rodent microglia. *J Immunol*; 183(12):7778-86.
- Mizoguchi Y, Monji A (2017) Microglial Intracellular Ca²⁺ Signaling in Synaptic Development and its Alterations in Neurodevelopmental Disorders. *Front Cell Neurosci*; 11:69.
- Mombaerts P (2004) Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited. *Curr Opin Neurobiol*; 14: 31-36.
- Moreno-Carranza B, Gentsch M, Stein S, Schambach A, Santilli G, Rudolf E, Ryser MF, Haria S, Thrasher AJ, Baum C, Brenner S, Grez M (2008) Transgene optimization significantly improves SIN vector titers, gp91phox expression and reconstitution of superoxide production in X-CGD cells. *Gene Ther*, 16(1):111-8.
- Mori, Takahashi YK, Igarashi KM, Yamaguchi M (2006) Maps of odorant molecular features in the Mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev*; 86: 409-433.
- Moriyoshi K, Richards L, Akazawa C, O'Leary D, Nakanishi S (1996) Labeling neural cells using adenoviral gene transfer of membrane-targeted GFP. *Neuron*; 16: 255-260.
- Moynagh PN, Williams DC, O'Neill LA (1993) Interleukin-1 activates transcription factor NF kappa B in glial cells. *Biochem J*; 294 (2):343-7.

- Nagayama S, Enerva A, Fletcher ML, Masurkar AV, Igarashi KM, Mori K (2010) Differential axonal projection of mitral and tufted cells in the mouse mainolfactory system. *Front Neural Circuits*; 4.
- Nagayama S, Homma R, Imamura F (2014) Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits*; 8:98.
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science*; 296 (5577): 2395-8.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100(24): 13940-5.
- Neary JT, Rathbone MP, Cattabeni F, Abbracchio MP, Burnstock G (1996) Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci*; 19(1):13-8.
- Neary JT, Zhu Q (1994) Signaling by ATP receptors in astrocytes. *Neuroreport*; 5(13):1617-20.
- Nieuwenhuys V, Van H (2008) Telencéfalo: introducción y sistema olfatorio en: El sistema nervioso central humano. Amsterdam, NL. Editorial Panamericana.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*; 308: 1314–1318.
- Nörenberg W, Langosch JM, Gebicke-Haerter PJ, Illes P (1994) Characterization and possible function of adenosine 5'-triphosphate receptors in activated rat microglia. *Br J Pharmacol*; 111(3):942-50.
- Ojeda SJ, De la Escalera JM (2004) Neuroanatomía Humana: aspectos funcionales y clínicos. Barcelona, ES. Elsevier Medical.
- O'Neill LA, Kaltschmidt C (1997) NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci*; 20(6):252-8.
- Orekhova EV, Stroganova TA, Nygren G, Tsetlin MM, Posikera IN, Gillberg C, Elam M (2007) Excess of high frequency electroencephalogram oscillations in boys with autism. *Biol Psychiatry*; 62: 1022–1029.

- Ortega M, Cruz I (2011) Evaluation of a constant rate infusion of lidocaine for balanced anesthesia in dogs undergoing surgery. *Can Vet J*; 52(8): 856-60.
- Oosenbrug T, van de Graaff MJ, Rensing ME, van Kasteren SI (2017) Chemical Tools for Studying TLR Signaling Dynamics. *Cell Chem Biol*; 24(7):801-812.
- Ozaki M, Kishigami S, Yano R (1998) Expression of receptors for neuregulins, ErbB2, ErbB3 and ErbB4, in developing mouse cerebellum. *Neurosci res*; 30:351-354.
- Pagliardini S, Janczewski WA, Tan W, Dickson CT, Deisseroth K, Feldman JL (2011) Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J. Neurosci*; 31: 2895–2905.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*; 333: 1456– 1458.
- Parrish-Aungst S, Shipley MT, Erdelyi F, Szabo G, Puche AC (2007) Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol*; 501: 825–836.
- Parkhurst, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan CN (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*; 155: 1596–1609.
- Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A (2012) Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 109 (4):E197-205.
- Paxinos G, Franklin K (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Second Edition, Academic Press, San Diego.
- Paxinos G, Watson C (1997) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego, CA. *Academic Press*.
- Persson AK, Estacion M, Ahn H, Liu S, Stamboulian-Platel S, Waxman SG, Black JA (2014) Contribution of sodium channels to lamellipodial protrusion and Rac1 and ERK1/2 activation in ATP-stimulated microglia. *Glia*; 62:2080–2095.

- Perry VH (1998) A revised view of the central nervous system micro environment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol*; 90: 113–121.
- Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*; 6: 193–201.
- Persson AK1, Estacion M, Ahn H, Liu S, Stamboulian-Platel S, Waxman SG, Black JA (2014) Contribution of sodium channels to lamellipodial protrusion and Rac1 and ERK1/2 activation in ATP-stimulated microglia. *Glia*; 62(12):2080-95.
- Petreaanu L, Huber D, Sobczyk A, Svoboda K (2007) Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat Neurosci*; 10(5): 663-8.
- Pinching AJ, Powell TP (1971) The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci*; 9: 305–345.
- Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*; 353(6345):670-4.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia A-S, McNamara JO, Williams SM (2008) Neurociencia. Buenos Aires, ARG. Editorial Panamericana.
- Raivich G1, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev*; 30(1): 77-105.
- Radu I, Bamann C, Nack M, Nagel G, Bamberg E, Heberle J (2009) Conformational changes of channelrhodopsin-2. *J Am Chem Soc*; 131(21): 7313-9.
- Rady I, Bamann C, Nack M, Nagel G, Bamberg E, Heberle J (2009) Conformational changes of channelrhodopsin-2. *Journal of the American Society*; 131: 7313-7319.
- Ragozzino D, Di Angelantonio S, Trettel F, Bertollini C, Maggi L, Gross C, Charo IF, Limatola C, Eusebi F(2006) Chemokine fractalkine/ CX3CL1 negatively

- modulates active glutamatergic synapses in rat hippocampal neurons. *J Neurosci*; 26:10488-10498.
- Rall W, Shepherd G (1968) Theoretical reconstruction of field potentials and dendrodendritic synaptic interactions in olfactory bulb. *J Neurophysiol*; 31: 884–915.
- Ribeiro XAL, Kress BT, Goldman SA, Lacerda de Menezes JR, Nedergaard M (2015) A Distinct Population of Microglia Supports Adult Neurogenesis in the Subventricular Zone. *J Neurosci*; 35(34): 11848-61.
- Rojas-García KD (2015) Regulación optogenética del bulbo olfatorio (Disertación de tesis de Licenciatura) UNAM, Qro.
- Rojas-Líbano D, Kay LM (2008) Olfactory system gamma oscillations: the physiological dissection of a cognitive neural system. *Cogn Neurodyn*; 2(3):179-94.
- Ross FM, Allan SM, Rothwell NJ, Verkhratsky A (2003) A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices. *J Neuroimmunol*; 144:61-67.
- Saghatelian A, Carleton A, Lagier S, de Chevigny A, Lledo PM (2003) Local neurons play key roles in the mammalian olfactory bulb. *J Physiol Paris* 97: 517-528.
- Sakano H (2010) Neural map formation in the mouse olfactory system. *Neuron*; 67: 530-542.
- Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W (1999) I κ B kinases phosphorylate NF- κ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem*; 274:30353–30356.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*; 74: 691–705.
- Schubert P, Rudolph KA, Fredholm BB, Nakamura Y (1994) Modulation of nerve and glial function by adenosine--role in the development of ischemic damage. *Int J Biochem*; 26(10-11):1227-36.
- Seo Y, Kim HS, Shin Y, Kang I, Choi SW, Yu KR, Seo KW, Kang KS (2014) Excessive microglial activation aggravates olfactory dysfunction by impeding

- the survival of newborn neurons in the olfactory bulb of Niemann-Pick disease type C1 mice. *Biochim Biophys Acta*; 1842(11):2193-203.
- Shepherd GM (2004) *The synaptic Organization of the Brain*. New York, NY. Oxford University Press.
- Shepherd GM (1972) Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev*; 52: 864-917.
- Sineshchekov OA, Jung KH, Spudis JL (2002). Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99: 8689–8694.
- Sosulki D, Bloom ML, Cutforth T, Axel R, Datta SR (2011) Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. *Nature*; 472: 213-216.
- Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*; 459: 698–702.
- Song HG, Young Kwon J, Soo Han H, Bae YC, Moon C (2008) First Contact to Odors: Our Current Knowledge about Odorant Receptor. *Sensors (Basel)*; 8(10):6303-6320.
- Sparacio SM, Zhang Y, Vilcek J, Benveniste EN (1992) Cytokine regulation of interleukin-6 gene expression in astrocytes involves activation of an NF-kappa B-like nuclear protein. *J Neuroimmunol*; 39(3):231-42.
- Spudis J (2006) The multitasking microbial sensory rhodopsins. *Trends Microbiol*; 14: 480–487.
- Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, Malenka RC (2005) Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . *J Neurosci*; 25:3219-3228.
- Stellwagen D, Malenka RC (2006) Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*; 440:1054-1059.
- Stettler D, Axel R (2009) Representations of odor in the piriform cortex. *Neuron*; 63: 854-864.
- Stockhorst U, Pietrowsky R (2004) Olfactory perception, communication, and the nose-to-brain pathway. *Physiol Behav*; 83(1): 3-11.

- Stoll G, Jander S (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol.*; 58(3): 233-47.
- Störtkuhl KF, Fiala A (2011) The Smell of Blue Light: A New Approach toward Understanding an Olfactory Neuronal Network. *Front Neurosci*; 5: 72.
- Stowers L, Marton TF (2005) What is a pheromone? Mammalian pheromones reconsidered. *Neuron*; 46(5):699-702.
- Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*; 40(2): 133-9.
- Swingler S, Easton A, Morris A (1992) Cytokine augmentation of HIV-1 LTR-driven gene expression in neural cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 8(4):487-93.
- Su CY, Menuz K, Carlson JR (2009) Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. *Cell*; 139(1): 45-59.
- Suzuki T, Yamasaki K, Fujita S, Oda K, Iseki M, Yoshida K, Watanabe M, Daiyasu H, Toh H, Asamizu E, Tabata S, Miura K, Fukuzawa H, Nakamura S, Takahashi T (2003) Archaealtype rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization. *Biochem Biophys Res Commun*; 301(3): 711-7.
- Tabary O, Boncoeur E, de Martin R, Pepperkok R, Clément A, Schultz C, Jacquot J (2006) Calcium-dependent regulation of NF-(kappa)B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Signal*; 18(5):652-60.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*; 21:335-76.
- Tatti R, Bhaukaurally K, Gschwend O, Seal RP, Edwards RH, Rodriguez I, Carleton A (2014) A population of glomerular glutamatergic neurons controls sensory information transfer in the mouse olfactory bulb. *Nat Commun*; 5: 3791.
- Telford WG, Shcherbakova D, Buschke D, Hawley T, Verkhusha VV (2015) Multiparametric flow cytometry using near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes. *PLoS One*; 10(3): 0122342.
- Tønnesen J, Sørensen AT, Deisseroth K, Lundberg C, Kokaia M (2009) Optogenetic control of epileptiform activity. *Proc Natl Acad Sci*; 106: 12162–12167.

- Tseng PH, Matsuzawa A, Zhang W, Mino T, Vignali DA, Karin M (2010). Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat Immunol*; 11, 70–75.
- Trushin, SA, Pennington KN, Algeciras-Schimmich A, Paya CV. 1999. Protein kinase C and calcineurin synergize to activate IB kinase and NF-B in T lymphocytes. *J Biol Chem*; 274:22923–22931.
- Tye KM, Deisseroth K (2012) Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nat Rev Neurosci*; 13(4): 251–266.
- van Ginkel FW, McGhee JR, Watt JM, Campos-Torres A, Parish LA, Briles DE (2003) Pneumococcal carriage results in ganglioside-mediated olfactory tissue infection. *PNAS*; 100:14363–14367.
- van Rossum D, Hanisch UK (2004) Microglia. *Metab Brain Dis*; 19(3-4): 393-411.
- Vargas AS (2014) Modulación de la actividad en el hipocampo por la activación de interneuronas (Disertación de tesis de Maestría en Ciencias). UNAM, Querétaro.
- Verhoefen M, Bamann C, Blocher R, Forster U, Bamberg E. The photocycle of channelrhodopsin-2: ultrafast reaction dynamics and subsequent reaction steps. *Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry*; 11: 3113-3122.
- Verkhatsky A, Kettenmann H (1996) Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci*; 19(8):346-52.
- Vezzani A, Viviani B (2015) Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology*; 96:70-82.
- Vroon A, Drukarch B, Bol JG, Cras P, Brevé JJ, Allan SM, Relton JK, Hoogland PV, Van Dam AM (2007) Neuroinflammation in Parkinson's patients and MPTP-treated mice is not restricted to the nigrostriatal system: microgliosis and differential expression of interleukin-1 receptors in the olfactory bulb. *Exp. Gerontol*; 42: 762–771.

- Wachowiak M, Shipley MT (2006) Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol*; 17: 411-423.
- Wake H, Moorhouse AJ, Miyamoto A, Nabekura J (2013) Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci*; 36(4):209-17.
- Walz W, Ilschner S, Ohlemeyer C, Banati FT, Kettenmann H (1993) Extracellular ATP Activates a Cation Conductance and a K⁺ Conductance in Cultured Microglial Cells from Mouse Brain. *The Journal of Neuroscience*; 13(10): 4403-4411.
- Wang D, Baldwin AS (1998) Activation of nuclear factor- κ B dependent transcription by tumor necrosis factor- α is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem*; 273:29411–29416.
- Wang AL, Yu AC, Lau LT, Lee C, Wu le M, Zhu X, Tso MO (2005) Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation. *Neurochem Int*; 47(1-2):152-8.
- Wang H, Peca J, Matsuzaki M, Matsuzaki K, Noguchi J, Qiu L, Augustine GJ (2007) High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 104(19): 8143-8148.
- Werneburg S, Feinberg PA, Johnson KM, Schafer DP (2017) A microglia-cytokine axis to modulate synaptic connectivity and function. *Curr Opin Neurobiol*; 47:138-145.
- Whiteside ST, Israel A (1997) I κ B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol*; 8:75–82.
- Wilson DA, Stevenson, RJ (2003) The fundamental role of memory in olfactory perception. *Trends Neurosci*; 26(5): 243-247.
- Wilson RS, Arnold SE, Schneider JA, Boyle PA, Buchman AS, Bennett DA (2009) Olfactory impairment in presymptomatic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*; 1170: 730–735.

- Willhite D, Nguyen K, Masurkar A, Greer C, Shepherd G, Chen W (2006) Viral tracing identifies distributed columnar organization in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103: 12592-12597.
- Williamson LL, Sholar PW, Mistry RS, Smith SH, Bilbo SD (2011) Microglia and memory: modulation by early-life infection. *J Neurosci*; 31: 15511–15521.
- Wood P (2003). *Neuroinflammation: Mechanisms and Management*. Humana Press.
- Wu WK, Li GR, Wong HP, Hui MK, Tai EK, Lam EK, Shin VY, Ye YN, Li P, Yang YH, Luo JC, Cho CH (2006) Involvement of Kv1.1 and Nav1.5 in proliferation of gastric epithelial cells. *J Cell Physiol*; 207:437–444.
- Xiao C, He P, Han J, Tang M, Wang Z, Mi Y, Liu X (2018) 1,3-Dichloro-2-propanol evokes inflammation and apoptosis in BV-2 microglia via MAPKs and NF- κ B signaling pathways mediated by reactive oxygen species. *Toxicol Lett*; 284:103-112.
- Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, Mogri M, Deisseroth K (2011) Optogenetics in neural systems. *Neuron*; 71(1):9-34.
- Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O’Shea DJ, Sohal VS, Goshen I, Finkelstein J, Paz JT (2011) Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*; 477:171–178.
- Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guillemins M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E, Jung S (2013) Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*; 38(1):79-91.
- Yoon SY, Patel D, Dougherty PM (2012) Minocycline blocks lipopolysaccharide induced hyperalgesia by suppression of microglia but not astrocytes. *Neuroscience*; 221:214-24.
- Yu SP, Choi DW (1997) Na(+)-Ca²⁺ exchange currents in cortical neurons: concomitant forward and reverse operation and effect of glutamate. *Eur J Neurosci*; 9(6): 1273–81.

- Zaborszky L, Carlsen J, Brashear HR and Heimer L (1986) Cholinergic and GABAergic afferents to the olfactory bulb in the rat with special emphasis on the projection neurons in the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band. *J Comp Neurol*; 243: 488–509.
- Zhang F, Wang LP, Brauner M, Liewald JF, Kay K, Watzke N, Wood PG, Bamberg E, Nagel G, Gottschalk A, Deisseroth K (2007) Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*; 446(7136): 633-9.
- Zhang F, Vierock J, Yizhar O, Fenno LE, Tsunoda S, Kianianmomeni A, Prigge M, Berndt A, Cushman J, Polle J, Magnuson J, Hegemann P, Deisseroth K (2011) The microbial opsin family of optogenetic tools. *Cell*; 147(7): 1446-57.
- Zhang J, Malik A, Choi HB, Ko RW, Dissing-Olesen L, MacVicar BA (2014) Microglial CR3 activation triggers longterm synaptic depression in the hippocampus via NADPH oxidase. *Neuron*; 82:195-207.

11. Lista de Abreviaturas

- (AAV) Virus Adeno-Asociado (por las siglas en inglés de Adeno-Associated virus)
- (ATP) Adenosín Trifosfato (por las siglas en inglés de Adenosine Triphosphate)
- (ATR) All-trans-retinal
- (BR) Bacteriorhodopsinas
- (BDNF) Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (por las siglas en inglés)
- (ChR2) Channelrhodopsina 2
- (COX-2) Ciclooxygenasa-2
- (MHC) Complejo mayor de histocompatibilidad (por las siglas en inglés de Major Histocompatibility Complex)
- (EPL) Capa plexiforme externa (por las siglas en inglés de External Plexiform Layer)
- (FAM) 5/6 Carboxifluoresceína
- (GABA) Ácido gama aminobutírico (por las siglas en inglés de Gamma-Aminobutyric Acid)
- (GFP) Proteína Verde Fluorescente (por las siglas en inglés de Green Fluorescent Protein)
- (GL) Capa glomerular (por las siglas en inglés de Glomerular Layer)
- (Glut) Glutamato
- (HR) Halorhodopsinas
- (IRF) Factores de Transcripción Reguladores de Inteferón
- (iNOS) Sintasa de Óxido Nítrico inducible, por sus siglas en inglés)
- (IP3) Inositol Trifosfato (por las siglas en inglés de Inositol trisphosphate)
- (IPL) Capa Plexiforme Interna (por las siglas en inglés de Inner Plexiform Layer)
- (LCR) Líquido Cefaloraquídeo
- (LCRA) Líquido Cefaloraquídeo Artificial
- (LED) Diodo de Emisión de Luz (por las siglas en inglés de Light-Emitting Diode)
- (LFP) Potencial de Campo Local (por las siglas en inglés de Local field potential)
- (LPS) Lipopolisacárido
- (LTP) Potenciación a Largo Plazo (por las siglas en inglés de Long Term Potentiation)
- (MAP kinases) Cinasas Activadas por Mitógeno (por las siglas en inglés de Mitogen-activated protein kinase)

(MCL) Capa de Células Mitrales (por las siglas en inglés de Mitral Cell Layer)

(NF- κ B) Factor Nuclear Potenciador de las Cadenas Ligeras Kappa de las Células B Activadas (por las siglas en inglés)

(NSO) Neurona Sensorial Olfatoria

(PAM-FAM) PAM (lipopéptido Pam2CSK4)-FAM (6 Carboxifluoresceína)

(PFA) Paramormaldehído

(PKC) Proteína Cinasa C (por las siglas en inglés de Protein Kinase C)

(PLC) Fosfolipasa C (por las siglas en inglés de Phospholipase C)

(RMS) Corriente Migratoria Rostral (por las siglas en inglés de Rostral Migratory Stream)

(ROS) Especies Reactivas de Oxígeno (por sus siglas en inglés)

(SNC) Sistema Nervioso Central

(SFFV) Virus Formador de Foco Esplénico (por las siglas en inglés de Spleen Focus Forming Virus)

(SVZ) Zona Subventricular (por las siglas en inglés de Subventricular Zone)

(TLR) Receptores de Tipo Toll (por las siglas en inglés de Toll Like Receptors)

(TNF α) Factor de Necrosis Tumoral Alpha (por sus siglas en inglés)

(TRF) Transformada Rápida de Fourier

(TTX) Tetrodotoxina

(UTP) Uridín Trifosfato (por las siglas en inglés de Uridine triphosphate)

(EYFP) Proteína Amarilla Fluorescente Potenciada (por las siglas en inglés de Enhanced Yellow Fluorescent Protein)

12. Anexos



Figura anexa 1.- Cirugía de implantación de un mini LED de emisión de luz azul para la activación optogenética de la microglía y la evaluación de la conducta olfatoria. a) Se muestra la adaptación de un LED de 3 mm x 3 mm a una estructura de pines hembra. El implante completo que recubre el LED ubicado sobre la zona de ambos BOs posterior a un procedimiento de cráneo rebajado es adaptado a pines macho conectados con una batería como fuente de energía para activar el LED.

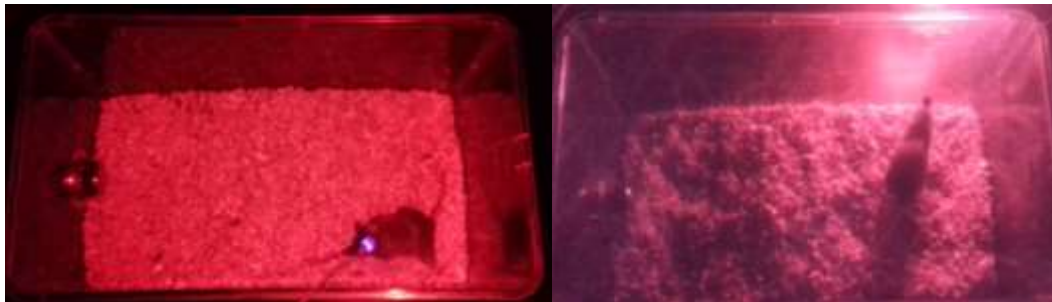


Figura anexa 2.- Prueba del alimento enterrado. La prueba olfatoria consistió en la determinación del tiempo de exploración del sujeto hasta encontrar un pedazo de galleta enterrado en aserrín y después de la estimulación optogenética. En la imagen de la izquierda se muestra un sujeto de prueba cuyo LED está siendo conectado a una fuente de energía para activarlo directamente sobre los BO's (en los experimentos reales la luz roja fue apagada para permitir que la única fuente de iluminación presente fuera la luz proveniente del LED azul implantado). Se muestra en la derecha un sujeto sometido a la prueba de detección olfatoria en la que realiza la exploración sobre el aserrín.

13. Lista de Tablas y Figuras

Tabla 1.- Oligonucleótidos que se usan para la genotipificación de los animales transgénicos CX3CR1-Cre

Tabla 2.- Oligonucleótidos que se usan para la genotipificación de los animales transgénicos Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE.

Figura 1.- Anatomía de la entrada sensorial olfatoria

Figura 2.- Organización anatómica del Bulbo Olfatorio (BO)

Figura 3.- Oscilaciones in vivo del Potencial de campo Local (LFP, por sus siglas en inglés) en el BO

Figura 4.- La microglía ramificada (en reposo) es altamente dinámica

Figura 5.- Herramientas moleculares optogenéticas

Figura 6.- Activación optogenética en la glía

Figura 7.- Protocolo de estimulación sensorial y fótica con luz azul durante el registro de la actividad electrofisiológica in vivo

Figura 8.- Protocolo de estimulación sensorial y fótica con luz ultravioleta durante el registro de la actividad electrofisiológica in vivo

Figura 9.- Microinyección con azul de pontamina para el establecimiento de las coordenadas

Figura 10.- Marcaje fluorescente de la EYFP que indica la presencia de ChR2 en la capa granular del BO en el ratón CX3CR1-Cre

Figura 11.- Figura 11.- Marcaje fluorescente en el BO del ratón transgénico CX3CR1-Cre/Rosa-CAG-LSL-ChR2 (H134R)-EYFP-WPRE.

Figura 12.- Expresión de GFP en la capa granular del BO

Figura 13.- Marcaje del lipopéptido PAM visualizado mediante el fluoróforo 5/6 carboxifluoresceína

Figura 14.- Expresión de ChR2 en la microglía de la capa granular del BO de un ratón transfectado con un vector viral

Figura 15.- Imágenes de Inmunofluorescencia que muestra la morfología microglial antes y después de la estimulación optogenética

Figura 16.- Genotipificación de los ratones CX3CR1-Cre

Figura 17.- Genotipificación de los ratones transgénicos CX3CR1-Cre/Rosa-ChR2 que expresan ChR2 de manera específica en la microglía

Figura 18.- La estimulación fótica disminuye la actividad espontánea de la capa granular del BO en ratones Chr2 (+) en la microglía

Figura 19.- Resumen del efecto inducido por la estimulación fótica en la potencia de la actividad de la capa granular del BO del grupo de ratones que expresaron Chr2 y de los grupos control

Figura 20.- La estimulación fótica de la microglía disminuye la actividad evocada por acetato de amilo en la capa granular del BO en ratones Chr2 (+)

Figura 21.- Resumen del efecto inducido por la fotoestimulación de la microglía en la actividad evocada por acetato de amilo en la capa granular del BO de los ratones que expresaron Chr2 y de los grupos control

Figura 22.- La estimulación fótica de la microglía disminuye la actividad evocada por esencia de limón en la capa granular del BO en ratones Chr2 (+)

Figura 23.- Resumen del efecto inducido por la fotoestimulación en la actividad evocada por esencia de limón en la capa granular del BO de los ratones que expresaron Chr2 y de los grupos control

Figura 24.- La activación microglial mediante el fármaco PAM-FAM disminuye la actividad evocada por acetato de amilo en la capa granular del BO en ratones C-57

Figura 25.- Resumen del efecto inducido por la estimulación con luz UV en la actividad evocada por acetato de amilo en la capa granular del BO de los ratones C57 inyectados intrabulbarmente con PAM-FAM y del grupo control

Figura 26.- La activación microglial mediante el fármaco PAM-FAM disminuye la actividad evocada por esencia de limón en la capa granular del BO en ratones C-57

Figura 27.- Resumen del efecto inducido por la estimulación con luz UV en la actividad evocada por esencia de limón en la capa granular del BO de los ratones C57BL/6 inyectados intrabulbarmente con PAM-FAM y del grupo control

Figura 28.- Resumen del efecto inducido por la activación microglial optogenética y por la activación mediante la estimulación óptica del lipopéptido PAM-FAM

Figura 29.- Efecto de la activación optogenética de la microglía en la capacidad olfatoria