



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Neurobiología

**MODULACIÓN POR NORADRENALINA DE LA CORRIENTE
ACTIVADA POR GABA EN LAS CÉLULAS ACCESORIAS-
PRINCIPALES DEL BULBO OLFATORIO DE RATA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

Biól. Olivia Saraí Trujeque Ramos

Directores de Tesis

Dr. José Jesús García Colunga

Dr. Jorge Larriva Sahd



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Olivia Saraí Trujeque Ramos, cuyo título es: “Modulación por noradrenalina de la corriente activada por GABA en las células accesorias-principales de bulbo olfatorio de rata” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Miguel Condés Lara

Secretario (Tutor)

Dr. José Jesús García Colunga

Vocal

Dr. Fernando Peña Ortega

Suplente

Dr. Jorge L.V. Flores Hernández

Suplente

Dr. Lenin Ochoa de la Paz

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Becario No: 220981

Al Dr. José Jesús García Colunga y Dr. Jorge LarrivaSahd.

Al Dr. Jorge Luis V. Flores Hernández del laboratorio de Neuromodulación del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Al Dr. José Bargas del Departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Al M.V.Z. José Martín García Servín, responsable del bioterio del INB de la UNAM.

A la Psic. María de Lourdes Lara Ayala, responsable de la unidad de videoconferencia del INB de la UNAM.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCCIÓN.....	8
2. ANTECEDENTES.....	11
2.1. Bulbo olfatorio accesorio	11
2.1.1. Fisiología del bulbo olfatorio accesorio	13
2.1.2. Células accesorias-principales.....	13
2.1.3. Farmacología de las células accesorias-principales	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVO GENERAL	20
6. OBJETIVOS PARTICULARES	20
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
7.1. Técnica de fijación de voltaje en célula completa.....	22
7.2. Aplicación de fármacos para la respuesta a GABA.....	23
7.3. Protocolos electrofisiológicos	23
8. RESULTADOS.....	26
8.1. Células accesorias-principales disociadas	26
8.2. Caracterización de parámetros electrofisiológicos	27
8.3. Registro de las corrientes de Na ⁺ y Ca ²⁺	28

8.4.	Registro de la corriente activada por GABA	29
8.5.	Inhibición por bicuculina de la corriente activada por GABA.	30
8.6.	Relación entre la concentración de GABA y la corriente activada por GABA en las células accesorias-principales	31
8.7.	Modulación por noradrenalina de la corriente activada por GABA	32
9.	DISCUSIÓN	37
9.1.	Caracterización de la corriente activada por GABA.....	37
9.2.	Bloqueo por bicuculina de la corriente activada por GABA	38
9.3.	Modulación por noradrenalina de la corriente activada por GABA	38
10.	CONCLUSIONES	42
11.	REFERENCIAS	43
12.	ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	48

RESUMEN

Registros electrofisiológicos en diferentes poblaciones de neuronas del bulbo olfatorio principal y accesorio sugieren que la acción neuromoduladora de la noradrenalina tiene un efecto tanto inhibitorio como potenciador de la comunicación neuronal y que este efecto es dependiente de la concentración de noradrenalina. Sin embargo, no es sino hasta este trabajo que se estudia la modulación por noradrenalina a nivel postsináptico en células disociadas del bulbo olfatorio accesorio de rata. Mediante la técnica de fijación de voltaje se caracterizó la modulación de la corriente activada por GABA en las células accesorias-principales, mismas que poseen un papel importante en la comunicación entre las células principales y las células granulares. Los resultados presentados en este trabajo muestran que la corriente activada por GABA en las células accesorias-principales es generada principalmente por la activación de receptores tipo GABA_A, ya que se presentó un bloqueo mayor al 50% de la corriente en presencia de bicuculina, también se observó que la aplicación de noradrenalina tiene un efecto inhibitorio sobre la corriente activada por GABA. Este efecto no depende de la concentración de noradrenalina, lo que indica que es suficiente la activación del receptor a noradrenalina para generar un efecto inhibitorio sobre la actividad del receptor GABA_A. Lo que a su vez puede explicar la especificidad en el control modulador de la información olfativa que es procesada en el bulbo olfatorio accesorio.

ABSTRACT

Electrophysiological recordings in different populations of the main and accessory olfactory bulb have suggested the modulatory effect of noradrenaline could either inhibit or potentiate the neuronal communication and that this effect is dose-dependent. However is until now that this work focuses on the study of the postsynaptic modulatory effect of noradrenaline in dissociated cells from the accessory olfactory bulb. Performing patch clamp recordings in dissociated cells it was possible to characterize the modulation of GABA activated currents in the main accessory cells, this cells by their location in the accessory olfactory bulb play an important part in the modulation between large principal cells and granule cells. The results presented in this study show that the GABA-activated currents in the main accessory cells are generated mainly by activation of GABA_A receptors since it was blocked about 50% in the presence of bicuculine. It was also found that noradrenaline inhibits the GABA activated current and that this effect is not dose-dependent on noradrenaline concentration, which may suggest that it is sufficient to noradrenaline receptor activation to promote an inhibitory effect on GABA_A receptor, which in turn could explain the specificity in the modulatory control in the olfactory information processed in the accessory olfactory bulb.

1. INTRODUCCIÓN

El bulbo olfatorio es una de las estructuras cerebrales más desarrolladas en la rata y constituye el primer relevo central del sistema olfatorio principal y del sistema olfatorio accesorio que inician en sus respectivos receptores: en la mucosa olfatoria y el órgano vomeronasal (De Castro, 2009). El sistema olfatorio principal se relaciona con la recepción e identificación de sustancias volátiles, mientras que el sistema olfatorio accesorio procesa e identifica sustancias hidrosolubles, no-volátiles, entre las que figuran las feromonas, éstas se definen como elementos de comunicación entre individuos conespecíficos y permiten la sincronización en las conductas de apareamiento y defensa (Brennan y Keverne, 2003). Por la capacidad de ambos sistemas de motivar y coordinar las respuestas conductuales fundamentales para las especies macrosmáticas (aquellas en las cuales el olfato está altamente desarrollado) la representación central del sistema olfatorio principal y accesorio ocupa un área sustancial de la superficie cerebral, área que en otros tetrápodos no dependientes del sentido del olfato, como los primates, es ocupada por la visión (Paxinos, 1995).

El sistema olfatorio principal consta de neuronas receptoras olfatorias, neuronas de primer orden localizadas en el epitelio olfatorio, cuyos axones proyectan al bulbo olfatorio principal formando el nervio olfatorio. Las neuronas de proyección central del bulbo olfatorio principal se encuentran agrupadas en el tracto olfatorio lateral, el cual a su vez, proyecta a las diferentes estructuras de la corteza olfatoria, entre ellas el núcleo olfatorio anterior, la corteza piriforme, el complejo amigdalino, la corteza entorrinal y al núcleo del tracto olfatorio lateral. Las principales conexiones intracorticales se dirigen hacia el hipocampo, tálamo e hipotálamo, así como a la neocorteza y a la corteza olfatoria contralateral. Por su parte, el sistema olfatorio accesorio incluye al órgano vomeronasal y al bulbo olfatorio accesorio (Halpen y Martínez-Marcos, 2003). Las neuronas de proyección del bulbo olfatorio accesorio mandan sus axones (así como también parte de los axones del tracto olfatorio lateral) al núcleo olfatorio anterior, al nervio del tracto olfatorio lateral y al complejo amigdalino, mientras que los axones de

las neuronas de dichas áreas corticales proyectan de regreso al bulbo olfatorio accesorio. Las proyecciones de la corteza olfatoria accesoria llegan al hipotálamo y al núcleo del tracto olfatorio lateral (De Castro, 2009) (Figura1).

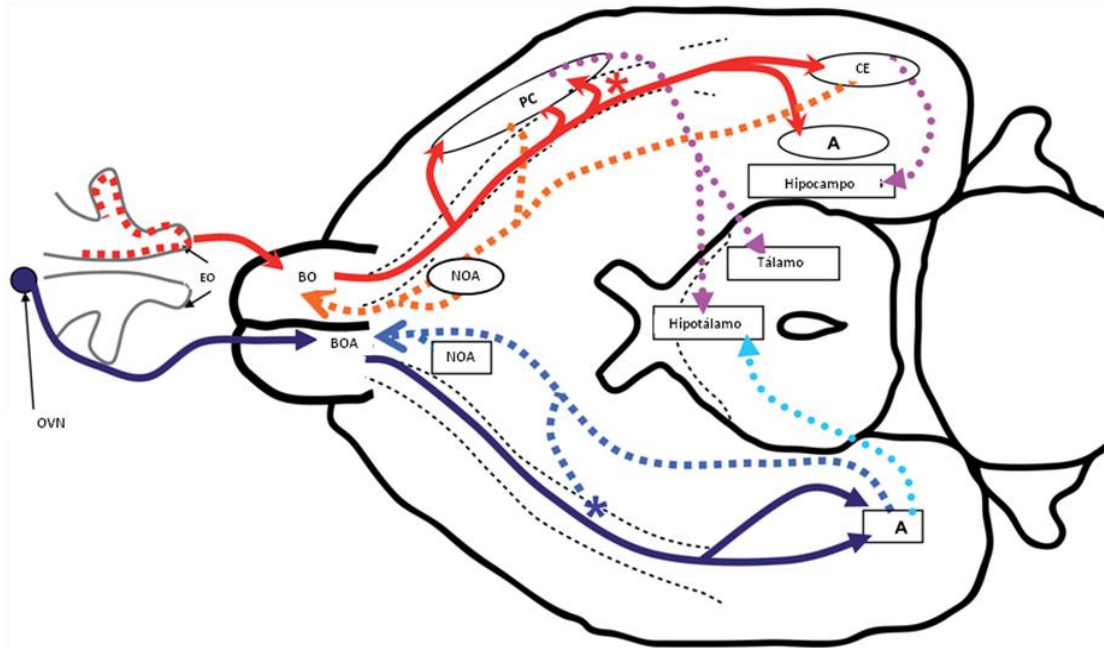


Figura 1. Esquema general de las conexiones del sistema olfatorio principal y accesorio. Axones de las neuronas del sistema olfatorio principal (puntos rojos dentro del epitelio olfatorio: EO). Bulbo olfatorio (BO). Núcleo olfatorio anterior (NOA), corteza piriforme (CP), complejo amigdalino (A), corteza entorrinal (CE), núcleo del tracto olfatorio lateral: nTOL (asterisco rojo). El nervio olfatorio y el TOL están representados con flechas rojas. Las neuronas de la corteza olfatoria y del nTOL proyectan de regreso al bulbo olfatorio (flechas naranjas). Principales conexiones intracorticales (flechas punteadas en violeta), órgano vomeronasal (OVN). Las neuronas de proyección en el BOA mandan sus axones (así como también parte de los axones del TOL) al NOA, al nTOL (asterisco azul) y al complejo amigdalino (flecha azul), mientras que los axones de las neuronas de dichas áreas corticales proyectan de regreso al BOA (flechas punteadas en azul claro). Proyecciones de la corteza olfatoria accesoria (flechas punteadas en turquesa).

Recientemente los tipos celulares que constituyen al bulbo olfatorio accesorio han sido caracterizados con mejor detalle y aunque las neuronas que lo conforman semejan en algunos aspectos a las neuronas del bulbo olfatorio principal, presentan una organización diferente, además también muestran semejanzas en cuanto a sus características citológicas, sin embargo su conectividad local y la distribución de sus procesos son fundamentalmente diferentes (Larriva-Sahd, 2008), aun cuando ambas estructuras están relacionadas funcionalmente (Brennan *et al.*, 1995., Brennan y Zufall, 2006).

Además de recibir proyecciones del bulbo olfatorio principal, del tracto olfatorio lateral y de fibras del núcleo olfatorio anterior, así como de diferentes estructuras corticales y subcorticales, el bulbo olfatorio accesorio posee dos tipos neuronales que al parecer son el blanco de dichas aferencias: las neuronas intersticiales del bulbo y las células accesorias-principales (Larriva-Sahd, 2008).

El proyecto aquí presentado tiene por objeto el estudio de éstas últimas, las células accesorias-principales, que por su disposición en el bulbo olfatorio accesorio podrían participar en el procesamiento de la información olfativa tanto del bulbo olfatorio principal como del accesorio, permitiendo un control específico en el procesamiento de la información olfativa (Larriva-Sahd, 2008). Por lo anterior, y tomando en cuenta que tanto el GABA (Jia *et al.*, 1999) como la noradrenalina (MacLean, 1989) son los principales neurotransmisores en la capa celular interna del bulbo olfatorio accesorio, cobra especial relevancia el estudio de la modulación de la corriente activada por GABA en esta población neuronal, lo cual nos proponemos mediante la técnica de fijación de voltaje en las células accesorias-principales disociadas.

2. ANTECEDENTES

El bulbo olfatorio es una estructura par que en la rata se localiza en la parte más frontal del encéfalo. Los bulbos olfatorios a su vez se divide en bulbo olfatorio principal y bulbo olfatorio accesorio, éste último constituye el primer relevo central de la información generada en lo órgano de Jacobson u órgano vomeronasal. En los roedores, el bulbo olfatorio accesorio, yace en la porción dorsal y caudal del bulbo olfatorio principal (Butler y Hodos, 2005) (Figura 2).

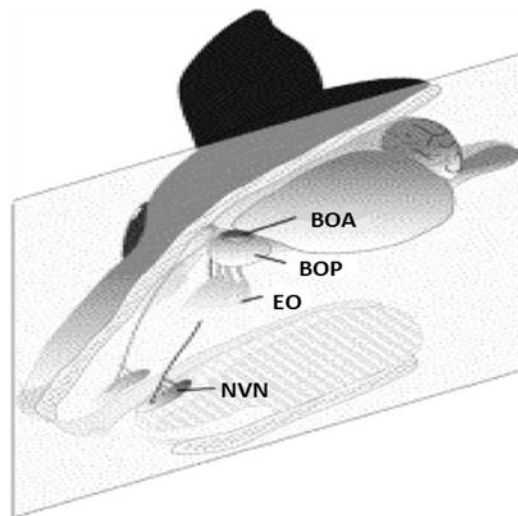


Figura 2. Vista sagital del cerebro de rata, indicando la ubicación de los bulbos olfatorios. Se muestran las principales estructuras que forman al sistema olfatorio principal y accesorio. NVN: nervio vomeronasal, EO: epitelio olfatorio, BOP: bulbo olfatorio principal, BOA: bulbo olfatorio accesorio (Modificado de Butler y Hodos, 2005).

2.1. Bulbo olfatorio accesorio

Al igual que el bulbo olfatorio principal, el accesorio es una estructura laminada que exhibe cinco capas; la más profunda yace sobre la sustancia blanca bulbar o medular. Las capas del bulbo olfatorio accesorio son, de la superficie pial a la médula bulbar: Capa I o capa de nervios vomeronasales; Capa II o Glomerular; Capa III o Celular

Externa, Capa IV o Tracto Olfatorio Lateral; Capa V o Celular Interna (Larriva-Sahd, 2008).

La capa celular externa contiene ocho tipos celulares distribuidos en tres áreas (Figura 3). La capa celular interna presenta tres tipos de neuronas: las células granulares internas, las neuronas intersticiales del bulbo y las células accesorias-principales. Las dendritas y axones de las células accesorias-principales en ambas mitades del bulbo olfatorio accesorio están organizadas simétricamente con respecto a un plano anatómico denominado línea alba; los axones colaterales de estas células posiblemente interactúan con neuronas GABAérgicas, lo que a su vez modularía el proceso de reconocimiento de sustancias específicas como las feromonas (Larriva-Sahd, 2008).

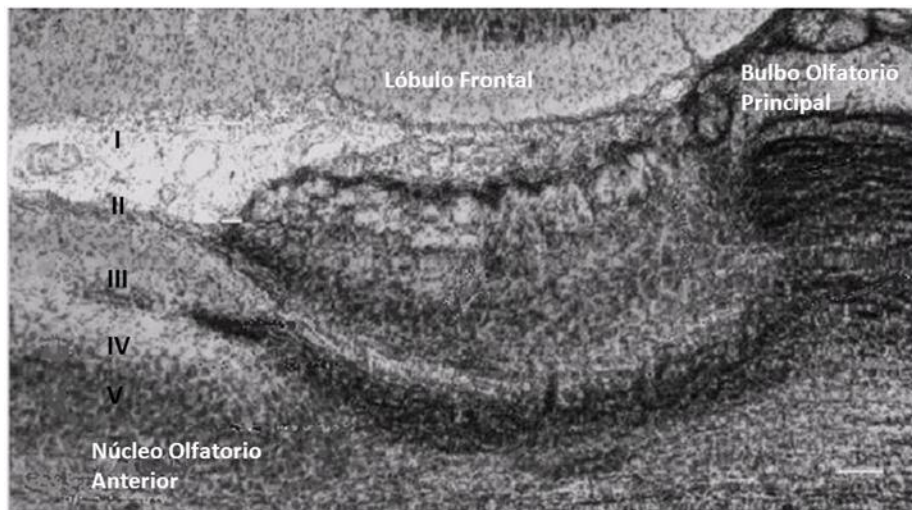


Figura 3. Corte sagital de bulbo olfatorio accesorio de la rata indicando las capas que lo conforman: I: capa del nervio vomeronasal, II: capa glomerular, III: capa celular externa, IV: tracto olfatorio lateral, V: capa celular interna (Modificado de Larriva-Sahd, 2008).

2.1.1. Fisiología del bulbo olfatorio accesorio

Una de las poblaciones celulares del bulbo olfatorio accesorio más estudiada lo es la célula mitral, que, proyecta hacia la amígdala, núcleos del lecho de la estría terminal e hipotálamo, áreas involucradas directamente con el comportamiento, en particular con las respuestas conductuales y endócrinas mediadas por feromonas.

En el sistema olfatorio principal, el flujo de información es controlado por una inhibición recurrente de las células mitrales por parte de las células granulares GABAérgicas, a través de sinapsis dendrodendríticas (Isaacson y Strowbridge, 1998). En el caso del sistema olfatorio accesorio, se ha propuesto que el arreglo neuronal que existe entre el bulbo olfatorio accesorio, el hipotálamo y la amígdala, funge como un circuito selectivo en el procesamiento de información olfativa (Brennan *et al.*, 1990), así como también la activación de éste circuito es determinante durante la formación de la memoria olfativa (Hayashiet *al.*, 1993).

A través de los estudios en el bulbo olfatorio principal realizados por Pressler y Strowbridge (2006), y Eyre (2008) se sabe que la célula granular está controlada presinápticamente por interneuronas, dicha modulación se debe a que las interneuronas, como las neuronas de Blanes (célula que exhibe enorme semejanza con las células accesorias-principales), utiliza GABA como neurotransmisor y provoca potenciales postsinápticos inhibitorios en la célula granular (Pressler y Strowbridge, 2006).

2.1.2. Células accesorias-principales

Estudios citológicos sugieren la existencia de dos poblaciones celulares que representan sitios específicos de convergencia estructural en el bulbo olfatorio

(Macrides y Schneider, 1982; Larriva-Sahd, 2008). Con impregnaciones de Golgi del bulbo olfatorio accesorio, se observa que el soma de las células accesorias-principales se localiza en la capa celular interna y emite dos conjuntos de dendritas varicosas que divergen desde la propia capa celular interna disponiéndose entre los axones del tracto olfatorio lateral y de la sustancia blanca medular (Figura 4) (Larriva-Sahd, 2008).

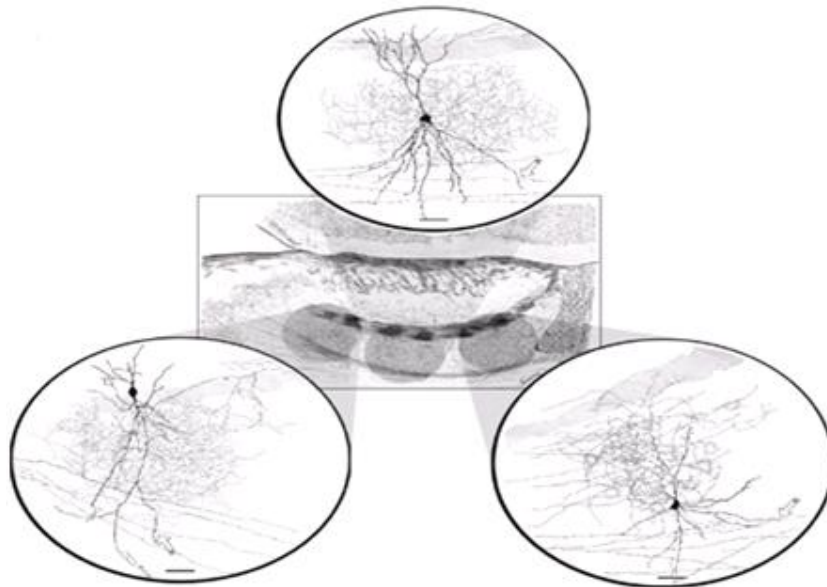


Figura 4. Células accesorias-principales en la capa celular interna. Distribución de las células accesorias-principales; el campo dendrítico de cada una de ellas se encuentra entrelazado por axones del tracto olfatorio lateral (Larriva-Sahd, 2008).

Dada la asociación del axón de las células accesorias-principales con las neuronas granulares adyacentes, único tipo celular adicional en la capa celular interna, se ha sugerido que las células accesorias-principales controlan presinápticamente a la célula granular interna, lo anterior, aunado al hecho de que las células granulares son la fuente más conocida de aferentes a las células principales, apoya la existencia de un circuito célula mitral-célula accesoria principal-célula granular-célula principal, lo que constituye un puente anatómico entre el bulbo olfatorio principal y accesorio (Larriva-Sahd, 2008) (Figura 5). Complementariamente, colaterales pequeñas de axones en el tracto olfatorio lateral y en la capa celular externa parecen terminar en las dendritas de

las células accesorias principales permitiendo una modulación en la vía de comunicación entre las aferentes provenientes del bulbo olfatorio accesorio, para posteriormente enviar dicha información a capas superiores en el bulbo olfatorio accesorio o directamente a corteza (Larriva-Sahd, 2008).

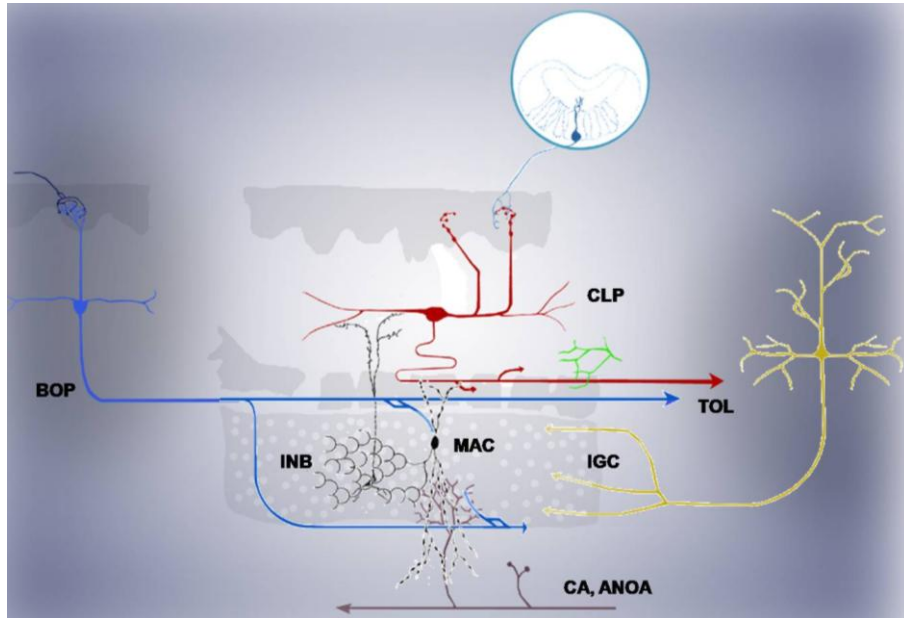


Figura 5. Circuito de comunicación entre el bulbo olfatorio principal y accesorio. Las células accesorias-principales como elemento en el circuito célula mitral-MAC-IGC (célula granular interna)-LPC (célula principal). Como se observa, el campo dendrítico de las células accesorias-principales (MACs) atraviesa las fibras eferentes del bulbo olfatorio principal así como también recibe colaterales tanto del bulbo olfatorio principal como del accesorio. TOL: tracto olfatorio lateral, BOP: bulbo olfatorio principal, INB: neurona intersticial del bulbo, CA: comisura anterior (aferentes), ANOA: aferentes del núcleo olfatorio anterior (Larriva-Sahd, 2008).

2.1.3. Fisiología de las células accesorias-principales

Aunque actualmente no se cuenta con trabajos que describan las características farmacológicas ni eléctricas de las células accesorias-principales del bulbo olfatorio accesorio, existen estudios que caracterizan éstas propiedades en algunas poblaciones

celulares en esta misma área y en las células de Blanes del bulbo olfatorio principal. Estos estudios proveen un panorama fisiológico del cual las células accesorias-principales forman parte.

En cuanto a la fisiología de las poblaciones celulares en las capas superiores del bulbo olfatorio accesorio, se ha reportado que las células mitrales (o principales) son moduladas en parte por las células periglomerulares. Registros electrofisiológicos en neuronas periglomerulares disociadas permitieron la caracterización de la respuesta a GABA en ésta población neuronal, donde dicha respuesta es mediada por receptores tipo GABA_A (Figura 6). Esta respuesta inhibitoria sobre las neuronas periglomerulares podría estar mediando eventos endócrinos en la rata al modular consecuentemente la actividad de las células mitrales (Goldmakher y Moss, 2000), mismas que a su vez se encuentran en el circuito de comunicación del cual las células accesorias-principales también forman parte.

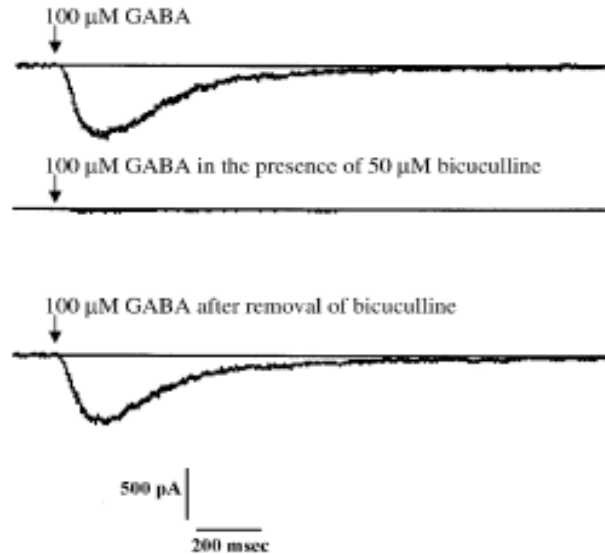


Figura 6. Aplicación de bicuculina sobre la corriente inducida por GABA en células periglomerulares. Se observa un bloqueo total de la corriente activada por GABA, confirmando de esta forma la participación del receptor GABA_A en la generación de la corriente (Goldmakher y Moss, 2000).

Además, se ha reportado que el *locus coeruleus*, provee de una importante inervación noradrenérgica al bulbo olfatorio accesorio (MacLean, 1989), determinante para el establecimiento de diferentes patrones de conducta en las ratas (Araneda y Firestein, 2006). Registros electrofisiológicos muestran que la noradrenalina promueve un aumento en la frecuencia de corrientes espontáneas postsinápticas inhibitorias en las células mitrales. Este efecto es atribuible a un incremento en la liberación de GABA sobre las eferencias de dichas poblaciones celulares (Figura 7). Los resultados muestran que la noradrenalina incrementa la liberación de GABA de las células granulares de la capa celular interna (Araneda y Firestein, 2006). Lo cual indica a su vez, lo determinante que es la inervación noradrenérgica para la modulación de las respuestas en los diferentes tipos celulares en ésta área del bulbo olfatorio accesorio.

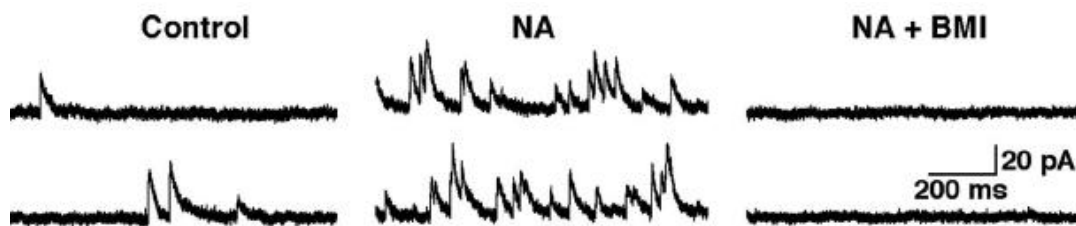


Figura 7. Incremento en la frecuencia de los IPSC GABAérgicos miniatura. Efecto excitatorio producido por la aplicación de noradrenalina 10μM y el bloqueo de su efecto por antagonista del receptor GABA_AMetil-yoduro de Bicuculina (BMI) 20 μM (Araneda y Firestein, 2006).

En el caso del bulbo olfatorio principal, es importante mencionar a una población de células que por su citología son parecidas a las neuronas de Cajal, las células de Blanes, las cuales se encuentran en la capa granular estableciendo sinapsis GABAérgicas con células granulares de la misma capa. Dada la ubicación de las células de Blanes en el bulbo olfatorio principal, éstas podrían representar un tipo celular semejante a las células accesorias-principales del bulbo olfatorio accesorio, ya que al igual que las células accesorias-principales por algún tiempo se les consideró como parte de la población de células granulares, sin embargo, poseen características

que les permiten diferenciarse de ellas., como por ejemplo, las células de Blanes son generalmente más grande, así como también presentan propiedades electrofisiológicas que permiten diferenciarlas de las células granulares (Pressler yStrowbridge, 2006).

Se ha reportado que la sinapsis entre las células de Blanes y las células granulares son GABAérgica (Pressler yStrowbridge, 2006). Mediante técnicas electrofisiológicas se estudió la respuesta de las células de Blanes al antagonista del receptor GABAA, gabazina, el cual bloqueó de manera reversible los potenciales postsinápticos inhibitorios sobre las células granulares (Figura 8). Confirmando de esta forma la participación del GABA como neurotransmisor en esta sinapsis, lo que a su vez, también puede sugerir la presencia importante del GABA como neurotransmisor en la capa celular interna del bulbo olfatorio accesorio.

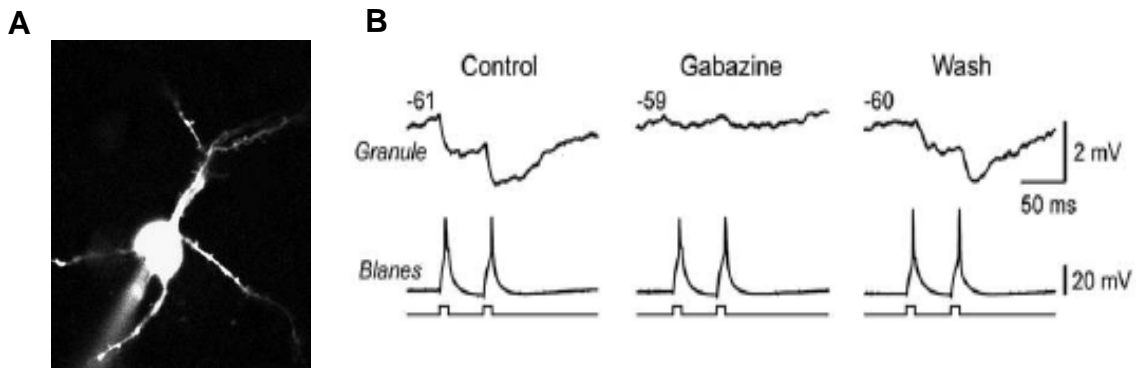


Figura 8. Células de Blanes del bulbo olfatorio principal. A) Célula de Blanes, se observa la presencia de varicosidades en las espinas dendríticas. B) respuesta de Gabazina(10 mM) en la sinapsis Blane-cell-célula granular (Pressler yStrowbridge, 2006).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El bulbo olfatorio de rata ha sido utilizado no sólo para el estudio de la fisiología sensorial sino también como modelo para el estudio de trastornos depresivos en ratas bulbectomizadas (Song y Leonard, 2005), así como para estudios de memoria (Sanchez-Andrade y Kendrick, 2009). Aun cuando se ha descrito la morfología y citología de las neuronas del bulbo olfatorio accesorio de la rata, no existen estudios electrofisiológicos ni farmacológicos que describan a las células accesorias-principales. Tomando en cuenta que el bulbo olfatorio accesorio recibe una amplia inervación noradrenérgica y que en especial la capa celular interna donde se encuentran las células accesorias-principales es modulada por sinapsis GABAérgicas, se decidió estudiar la respuesta a GABA y su modulación por noradrenalina en las células accesorias-principales disociadas.

En base a estos antecedentes la relevancia del este estudio radica en que las células accesorias-principales podrían participar en un circuito de regulación inhibitoria en el procesamiento de la información olfativa, misma que se vería afectada por la inervación noradrenérgica en el bulo olfatorio accesorio, lo que modularía el proceso de reconocimiento de sustancias específicas como las feromonas.

Por lo anterior nos planteamos el siguiente supuesto:

4. HIPÓTESIS

Las células accesorias-principales del bulbo olfatorio accesorio responden a GABA generando corrientes iónicas moduladas negativamente por noradrenalina con un comportamiento dependiente de la concentración.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la respuesta a GABA y su modulación por noradrenalina en las células accesorias-principales del bulbo olfatorio accesorio de rata.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

En las células accesorias-principales, recién dissociadas, del bulbo olfatorio accesorio de ratas de un mes de edad,

- determinar las propiedades eléctricas pasivas.
- determinar la presencia de corrientes iónicas de Na^+ y Ca^{2+} que son características de neuronas.
- estudiar la respuesta a GABA a través de una curva dosis-respuesta y el bloqueo específico por bicuculina.
- estudiar la modulación por noradrenalina de la respuesta a GABA utilizando diferentes concentraciones del modulador.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo de disociación que se empleó fue previamente descrito (Flores-Hernández, *et al.*, 2000., Flores-Hernández, *et al.*, 2002) el cual se describe brevemente a continuación:

Las ratas fueron proporcionadas por el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, machos, de 100-120 g, mismas que fueron anestesiadas con cloroformo y decapitadas. Posteriormente se extrajo el cerebro, se colocó en una solución fría de isetionato de sodio con bajo calcio (en mM): 140 isetionato de sodio, 2 KCl, 2 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 23 glucosa, 15 HEPES, pH= 7.4, 300-310 mOsm/l y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 N^G-nitro-L-arginina y 1 ácido kinurénico, constantemente oxigenadas. Posteriormente, se obtuvieron rebanadas parasagitales de 350 µm de espesor, con ayuda de un vibratomo, sumergidas en la misma solución. De las rebanadas obtenidas se disecó el bulbo olfatorio accesorio (Figura 9).

Las rebanadas se mantuvieron de 1 a 6 horas a temperatura ambiente (20-22° C) en una solución salina de Earle amortiguada con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 N^G-nitro-L-arginina y 1 ácido kinurénico, burbujeada con 95% O₂/ 5% CO₂, pH= 7.4 ajustada con NaOH, 300-310 mOsm/l.

Posteriormente se tomó una rebanada de bulbo olfatorio accesorio para el tratamiento enzimático; el cual se realizó en una cámara de cultivo en 40 ml de solución salina de Hanks, amortiguada con HEPES y burbujeada con O₂, pH= 7.4, ajustada con NaOH, 300-310 mOsm/l, conteniendo 1 mg/ml de papaína a 35° C, durante 15 min suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión y 0.1 N^G-nitro-L-arginina y 1 ácido kinurénico.

Transcurrido el tiempo de la digestión enzimática, el tejido fue lavado con la solución de isetionato de sodio y disociado mecánicamente con pipetas Pasteur de diferentes calibres (pulidas con fuego). La suspensión de células fue sembrada en una caja de registro montada en un microscopio invertido. Después de 10 minutos de incubación, la suspensión fue lavada con una solución de fondo (en mM): 140 NaCl, 23 glucosa, 15 HEPES, 2 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂ y 1% rojo fenol, oxigenada constantemente, pH= 7.4 ajustado con NaOH, 300-310 mOsm/l para su posterior registro por medio de la técnica de fijación de voltaje.

7.1. Técnica de fijación de voltaje en célula completa.

Se empleó la técnica de fijación de voltaje en célula completa (Hamill *et al.*, 1981), con algunas modificaciones en los protocolos electrofisiológicos utilizados. Los electrodos de registro fueron estirados de tubos capilares de borosilicato, con una resistencia de 5 a 7 MΩ.

Las soluciones tanto interna como externa se mencionan a continuación:

- Solución interna: (en mM): 175 NMDG, 40 HEPES, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 12 fosfocreatina di-tris sal, 3 Na₂ATP, 0.35 Na₃GTP, 0.1 leupeptina, pH= 7.3 con H₂SO₄.
- Solución externa: (en mM): 127 NaCl, 20 CsCl, 5 BaCl₂, 2 CaCl₂, 12 glucosa, 10 HEPES, pH = 7.3 con NaOH. En el caso de la aplicación de noradrenalina se utilizó 1.5 mM de ácido ascórbico para prevenir la oxidación del neurotransmisor.

Los registros se obtuvieron mediante la técnica de fijación de voltaje con un amplificador Axopatch 700A (Axon Instruments Foster City, CA) y controlado con el programa pClamp Versión 8 (Axon Instruments) ejecutado en una computadora tipo Pentium con una interfase Digidata 1322A (Axon Instruments).

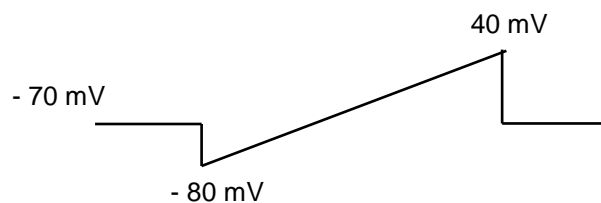
7.2. Aplicación de fármacos para la respuesta a GABA

Para la inducción y modulación de la corriente activada por GABA, se aplicó éste último a través de un sistema de dos capilares con un ángulo de 45° entre ellos y una distancia de 200 a 600 μm de la célula a registrar. Un capilar llevó la solución externa (control) y el otro llevó esta misma más el neurotransmisor o fármaco a utilizar. El intercambio de solución se realizó por la apertura de válvulas solenoides (The Lee Company, Essex CO LFAA 1201718H) comandadas por la salida digital del sistema digidata 1322A de Axon Instruments y un dispositivo de control fabricado en el laboratorio para alternar la aplicación de las soluciones.

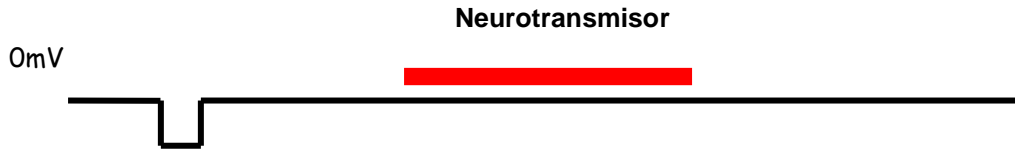
La célula fue bañada por la solución del primer capilar con la solución externa o control, después del cambio, la célula fue bañada por la solución del segundo capilar conteniendo el ligando a probar durante 3 segundos, para posteriormente regresar a la solución control. El tiempo en que el electrodo detecta el cambio de las condiciones iónicas entre una solución y otra es de 6 ms.

7.3. Protocolos electrofisiológicos

- Para generar las corrientes de Ca^{2+} y Na^{+} , se aplicaron rampas de voltaje, de -80 a 40 mV, durante 195 ms.

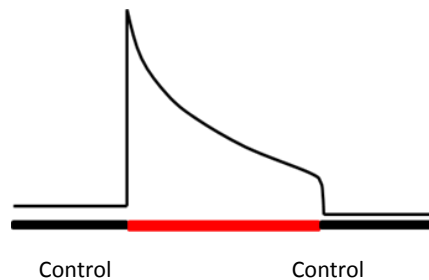


- Aplicación de GABA durante 3 segundos a un potencial de mantenimiento de 0 durante mV 75 segundos (Se decidió fijar el voltaje a 0 mv ya que es un potencial alejado del potencial de equilibrio para el Cl^- -95mV , lo que permite observar una corriente mucho mas grande a dicho potencial de mantenimiento).

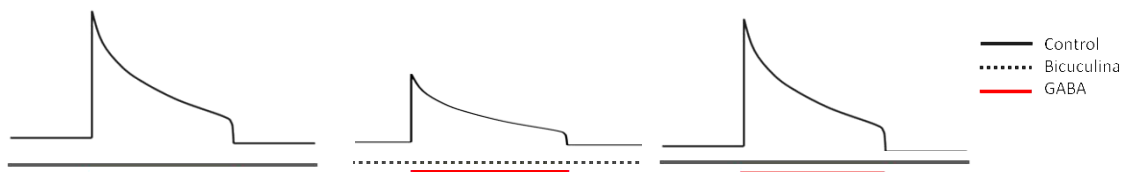


- Diseño de los grupos experimentales para la coaplicación de neurotransmisores utilizando el protocolo de aplicación de GABA:

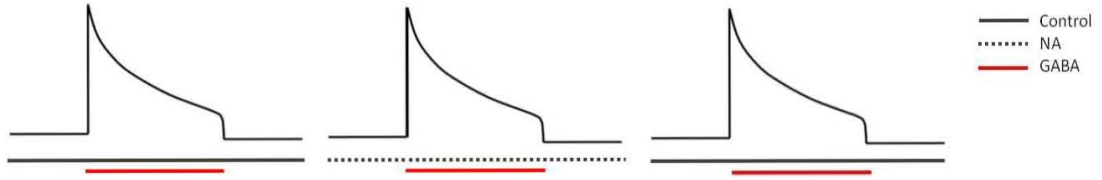
1. **Grupo control:** donde solo se aplicó GABA $100\mu\text{M}$; para condiciones control y como lavado del efecto de dicho neurotransmisor.



2. **Grupo bicuculina:** en este grupo se coaplica la bicuculina con GABA, es decir, la bicuculina se encuentran presente durante todo el registro.



3. **Grupo noradrenalina:** en este grupo se coaplica la noradrenalina con GABA, es decir, la noradrenalina se encuentran presentes durante todo el registro.



8. RESULTADOS

8.1. Células accesorias-principales disociadas

Para cada día de experimento se utilizó una rata, de la cual se obtuvieron hasta 4 rebanadas del bulbo olfatorio accesorio, que mide 1.8, 1.1 y 1 mm en el eje rostrocaudal, horizontal y vertical respectivamente (Figura 9) (Larriva-Sahd, 2008). Una vez disecada el área correspondiente a la capa celular interna y sometida al tratamiento enzimático se pueden obtener de 3 a 4 células accesorias-principales en buen estado.

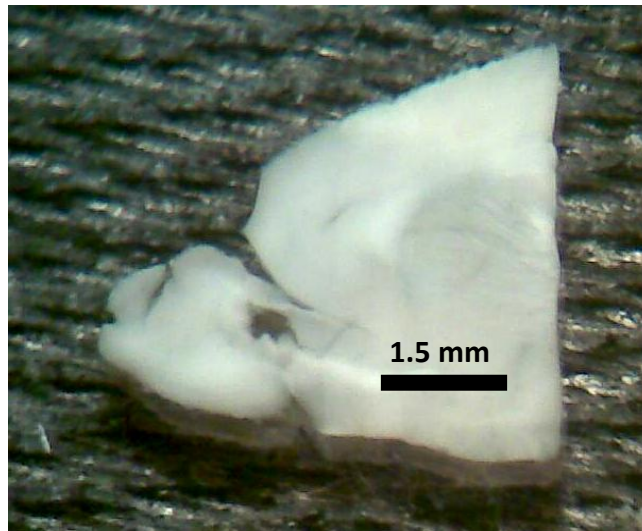


Figura 9. Areadisectada del bulbo olfatorio accesorio. Corte sagital de cerebro de rata donde se observa el área que se disecta del bulbo olfatorio accesorio de rata.

Se registraron un total de 37 células accesorias-principales, las cuales fueron identificadas de acuerdo a su morfología característica; principalmente, la forma de pera del soma (Figura 9) de aproximadamente 20 μm (lo que permitió diferenciarlas de las células granulares que también están presentes en la capa celular interna y cuyo soma se encuentra alrededor de los 14 μm) (Figura 10). En algunas ocasiones se pudieron

observar dendritas con varicosidades, otra característica distinguible de las células accesorias-principales (Larriva-Sahd, 2008).

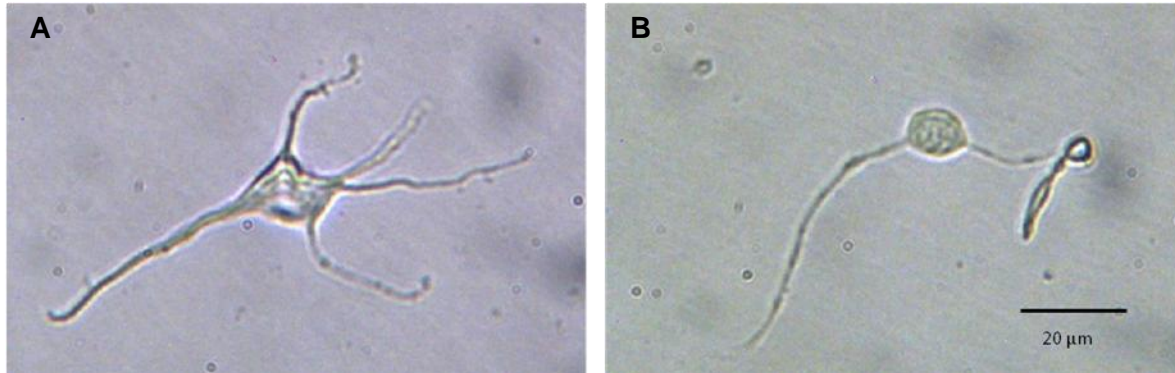


Figura 10. Células del bulbo olfatorio accesorio de rata. A) Célula accesoria-principal disociada. B) Célula granular. Se aprecian las diferencias morfológicas entre los 2 tipos celulares que se encontraron durante los experimentos. La barra de calibración aplica para ambas imágenes.

8.2. Caracterización de parámetros electrofisiológicos

Para cada una de las células registradas, se determinó la capacitancia de membrana (C_m , de 8 a 13 pF). Este parámetro depende básicamente de la membrana plasmática de la célula, incluyendo la cantidad de dendritas después de la disociación. Células por debajo de estos valores capacitivos no se tomaron en cuenta para el registro, así como también, sólo se consideraron aquellas células que presentaron una resistencia de membrana (R_m) mayor a 800 M Ω y una resistencia de acceso (R_a) < 25 M Ω , células con una resistencia de membrana menor a 800 M Ω indican que el sello que se forma entre el cristal de la pipeta y la membrana es débil y por lo tanto puede haber fuga de corriente durante el registro, por otra parte, una resistencia de acceso mayor a 25 M Ω indica que la resistencia entre la pipeta y el interior celular está aumentando, lo que a su vez interfiere con el flujo de corriente que se está registrando. Dichos parámetros fueron

monitoreados durante el registro. Una muestra representativa (n = 37) de estos parámetros se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros electrofisiológicos en células accesorias-principales. Se muestra la media de la Capacitancia (Cm), Resistencia de membrana (Rm) y Resistencia de acceso (Ra) n = 37.

Parámetro	Media	E.S.M.
Cm (pF)	8.62	0.57
Rm (GΩ)	1.51	0.13
Ra (MΩ)	22.41	1.38

8.3. Registro de las corrientes de Na⁺ y Ca²⁺

Al inicio de cada registro se aplicó a la célula una rampa de voltaje de -80 mV a +40 mV con una duración de 195 ms, para determinar la presencia de corrientes de Na⁺ y Ca²⁺, lo cual se tomó como indicativo de la viabilidad celular y de su naturaleza neuronal. En todas las células registradas las rampas aplicadas generaron una corriente rápida de Na⁺, aproximadamente a los -45 mV, seguidas por una corriente de Ca²⁺ más lenta y de menor amplitud. Las corrientes de Na⁺ registradas en las células accesorias-principales fueron desde -1000 pA hasta mas de -4000 pA, en tanto que las corrientes de Ca²⁺ alcanzaron valores máximos de -500 pA, lo que dependió, como se mencionó anteriormente, de la capacitancia de las células registradas (Figura 11). Dadas las condiciones experimentales, no se observó la corriente de K⁺, debido a que se bloqueó con Cs y Ba²⁺ presentes en la solución externa.

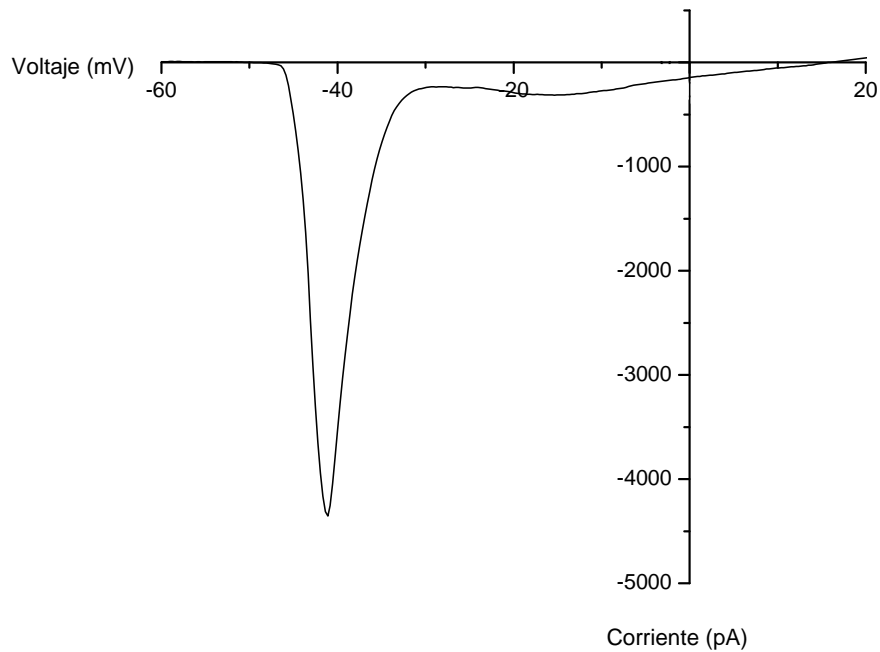


Figura 11. Corrientes de Na⁺ y Ca²⁺ en células accesorias-principales. Registro representativo donde se observa la generación de la corriente de Na⁺ cerca de los 45 mV, posteriormente se observa la corriente de Ca²⁺ más lenta y de menor amplitud.

8.4. Registro de la corriente activada por GABA

A continuación, se estudió la generación de la corriente activada por GABA en las células accesorias-principales, para ello se utilizó el protocolo de aplicación como se menciona en la metodología. En todas las neuronas a las que se aplicó GABA 100 μ M (Goldmakher y Moss, 2000) se generó una corriente saliente a un voltaje de mantenimiento de 0 mV. Dicha corriente se generó rápidamente alcanzando un máximo inmediato a la aplicación (aproximadamente a los 118 ms), así como también presentó un decaimiento rápido de la corriente, aún en presencia del neurotransmisor. Este efecto se debe principalmente a la desensibilización de los receptores que fueron previamente activados, ya que aún cuando el neurotransmisor continúa presente no se logra prolongar la apertura de éstos (Figura 12).

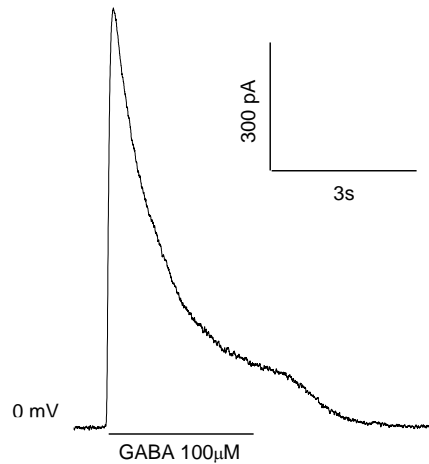


Figura 12. Registro representativo de la corriente activada por GABA en células accesorias-principales. Se observa la corriente generada por la aplicación de GABA μM , alcanzando una amplitud máxima de aproximadamente 950 pA a 0 mV.

8.5. Inhibición por bicuculina de la corriente activada por GABA.

Dadas las características de la corriente activada con GABA, se utilizó bicuculina, un antagonista específico de receptores GABA tipo A (Hille, 1991), a fin de determinar la participación de este tipo de receptor. En estas condiciones se registraron cuatro células; la corriente fue activada con 100 μM de GABA y la concentración de bicuculina utilizada fue de 25 μM (Jia *et al.*, 1999), dado que corresponde a la concentración de bicuculina que inhibe aproximadamente el 70% de la corriente máxima (Hartmann *et al.*, 2004).

La bicuculina bloqueó la corriente activada por GABA, con una media de 48.97 ± 4.59 respecto a su control (Figura 13). Este bloqueo parcial de la corriente puede indicar por una parte, una diferencia en cuanto a la afinidad de los receptores a GABA_A que estén participando en la generación de la corriente, o por otra parte, que ésta respuesta este medida por la activación conjunta de receptores GABA_A extrasinápticos que poseen características específicas que les permiten promover una inhibición tónica a nivel postsináptico reduciendo la sensibilización del receptor (Belelli D *et al.*, 2009).

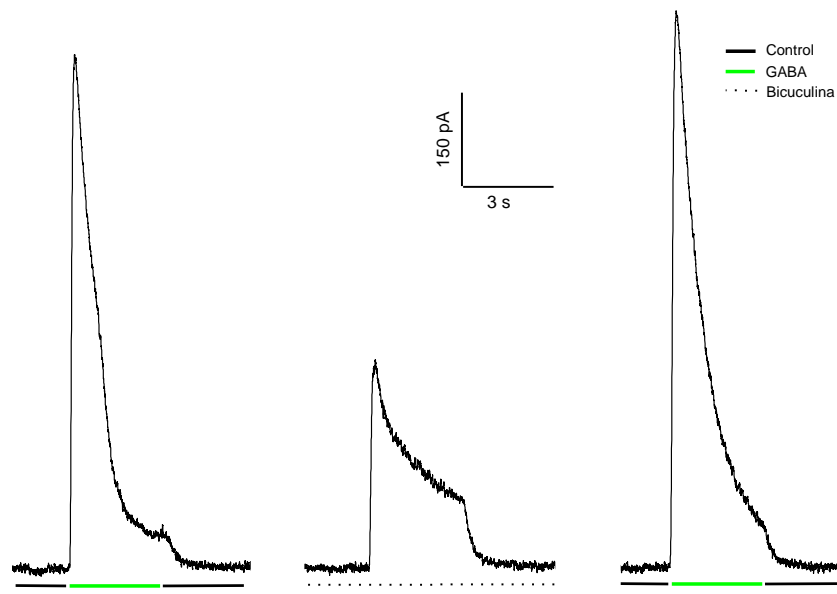


Figura 13. Efecto de la bicuculina sobre la corriente activada por GABA en células accesorias-principales. Registro representativo del bloqueo de la corriente activada por GABA (100 μM) en presencia de bicuculina (25 μM) $n = 4$.

8.6. Relación entre la concentración de GABA y la corriente activada por GABA en las células accesorias-principales

Para conocer el efecto de la concentración de GABA en la generación de la corriente se aplicaron diferentes concentraciones del neurotransmisor en 15 células: 1, 10, 20, 30, 50 y 100 μM (Figura 14A). No todas las concentraciones fueron probadas en cada célula. A partir de 20 μM se empieza a observar la generación de la corriente, cuya amplitud aumenta al aumentar la concentración de GABA, hasta llegar a la saturación a medida que continúa aumentando la concentración de GABA.

Posteriormente, para calcular la concentración efectiva 50 (CE_{50}) de GABA, (cuyo valor corresponde a la concentración a la cual se observa el 50% de la corriente máxima en las células accesorias-principales, se tomó en cuenta la densidad de corriente (pA/pF), la cual indica una relación entre el valor máximo de la corriente y el tamaño de la célula para estandarizarla de acuerdo a su capacitancia. Con los datos

obtenidos de la densidad de corriente se realizó un ajuste con la ecuación de Hill $[Y=A_1+(A_2-A_1)/(1+10^{-(\log x_0-x)^p})]$ utilizando el programa Origin 7.0, obteniéndose un valor para la CE_{50} de 20 μM y un coeficiente de Hill de 3.23 (Figura 14B). Así, la concentración de GABA utilizada para los registros posteriores fue de 50 μM , asegurando de esta forma un efecto mayor al 50% y, como se mencionó anteriormente, es una concentración en la que se observa con claridad la corriente activada por GABA. Cabe mencionar que esta concentración de GABA ha sido la utilizada en estudios previos en el bulbo olfatorio accesorio (Goldmakher y Moss, 2000).

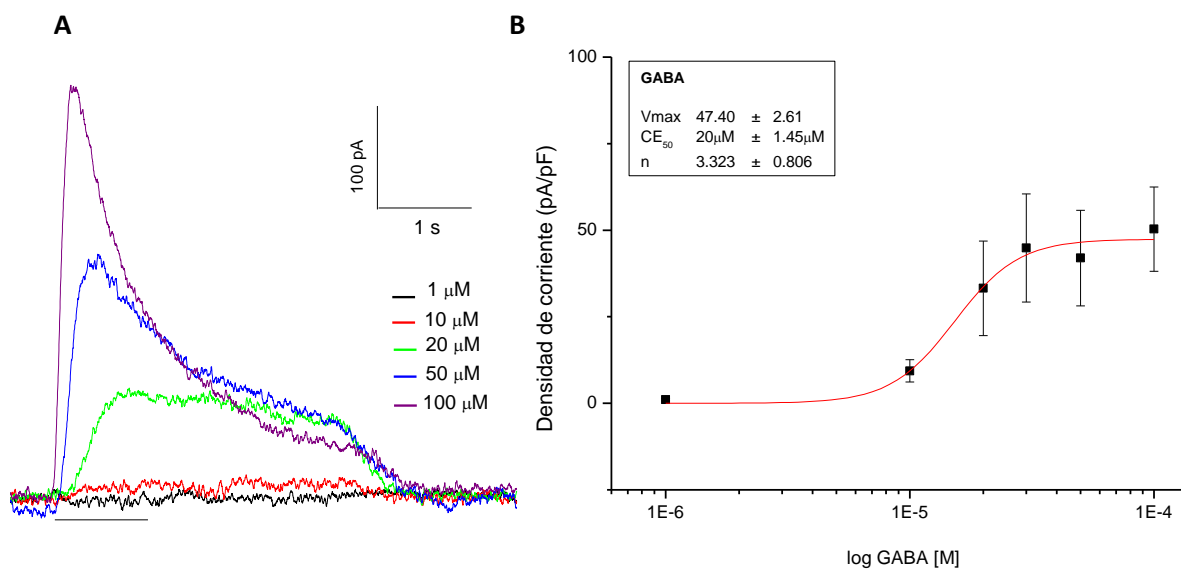


Figura 14. Relación entre la concentración de GABA y la corriente iónica. A) Registro representativo donde se observa la generación de la corriente y su amplitud conforme se incrementa la concentración GABA. B) Curva de la concentración-respuesta de la corriente activada por GABA. Se graficó la densidad de corriente contra la concentración de GABA, cada punto indica el efecto \pm ESM; obteniéndose una CE_{50} de 15 μM , $n = 15$ células.

8.7. Modulación por noradrenalina de la corriente activada por GABA

Estudios previos en el bulbo olfatorio de mamíferos sugieren que la noradrenalina ejerce un efecto modulador sobre la inhibición GABAérgica tanto en el bulbo olfatorio principal como en el bulbo accesorio (Naiet *al.*, 2009., Trombley y Shepherd, 1992.,

Araneda y Firestein, 2006). Sin embargo, a la fecha no existen estudios en el bulbo olfatorio accesorio que caractericen a nivel postsináptico el efecto de la noradrenalina sobre la corriente activada por GABA. Para examinar esta posibilidad se decidió estudiar dicho efecto en las células accesorias-principales.

Se registraron 18 células accesorias-principales. La corriente fue activada con 50 μM de GABA, las concentraciones de noradrenalina utilizadas fueron: 1, 3, 10 y 30 μM . No todas las concentraciones de noradrenalina fueron aplicadas a una misma célula. La noradrenalina en el orden micromolar tuvo un efecto inhibitorio de la corriente activada por GABA, observándose un bloqueo del 10 al 20% desde las concentraciones micromolares más bajas (Figura 15).

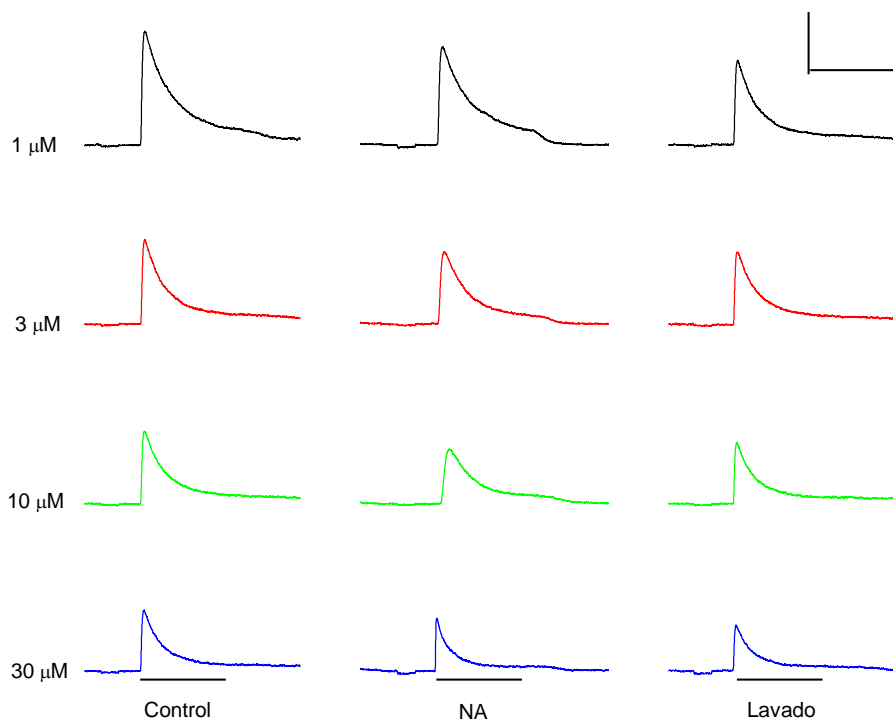


Figura 15. Bloqueo por noradrenalina de la corriente activada por GABA. Registro representativo donde se observa un bloqueo de $\sim 20\%$ de la corriente desde la aplicación de 1 μM de noradrenalina en las células accesorias principales. Las barras de calibración: 500 pA y 3 segundos. $n = 12$.

Tomando en cuenta el porcentaje de bloqueo de la corriente activada por GABA con concentraciones micromolares de noradrenalina, donde la concentración de 30 μM produjo un menor bloqueo que concentraciones mas bajas, se decidió aplicar las siguientes concentraciones: 10 y 100 femtomolar, 1, 30 y 300 picomolar y 10 y 30 nanomolar, esperando encontrar un efecto mayor de acuerdo a la cinética que se había presentado. Sin embargo, se siguió observando un efecto similar al observado con concentraciones micromolares (Figura 16A). Para descartar la posibilidad de que el efecto inhibitor de la noradrenalina aún a bajas concentraciones se viera enmascarado por la desensibilización de receptores a GABA, se aplicó GABA varias veces durante el registro (Figura 16B).

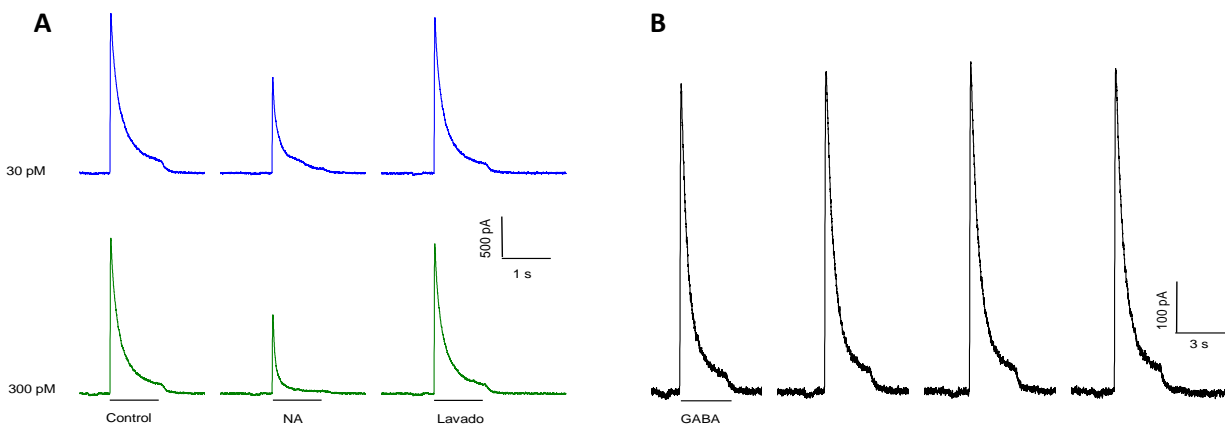


Figura 16. Bloqueo de la corriente activada por GABA con bajas concentraciones de noradrenalina. A) Registro representativo donde se observa un bloqueo con concentraciones picomolares de noradrenalina de ~30% la corriente activada por GABA, en las células accesorias principales. **B)** Registro de la corriente activada por aplicaciones repetidas de GABA, en células accesorias-principales, $n = 6$.

Así, para conocer la dependencia de la concentración de noradrenalina del efecto inhibitor de la corriente activada por GABA, se graficó el porcentaje de inhibición de la corriente en función de las concentraciones de noradrenalina (Figura 17), observándose un efecto de U invertida semejante entre las diferentes concentraciones.

Aquí es importante notar cómo concentraciones en el orden de picomolar e incluso femtomolar muestran un efecto inhibitorio semejante al efecto que tienen concentraciones mayores, del orden micromolar.

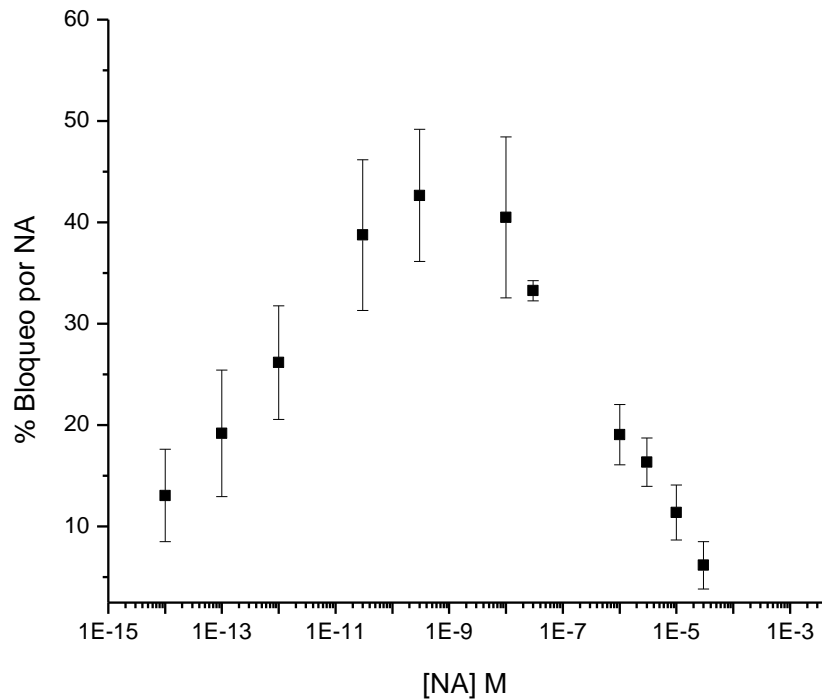


Figura 17. Bloqueo por noradrenalina de la corriente activada por GABA en células accesorias-principales. Se observa una inhibición de ~45% la corriente activada por GABA, desde 10 nM de noradrenalina. Tanto concentraciones femtomolares como micromolares presentan un porcentaje de bloqueo semejante. n=18.

Finalmente para saber si los cambios en la cinética del estado de desensibilización observados al aplicar noradrenalina eran dependientes de la concentración se evaluó el valor de Tau (constante de desensibilización) para cada concentración. A realizar la prueba de ANOVA sólo se encontraron diferencias significativas para las concentraciones 30 picomolar y 30 nanomolar ($p > 0.05$) (Figura 18).

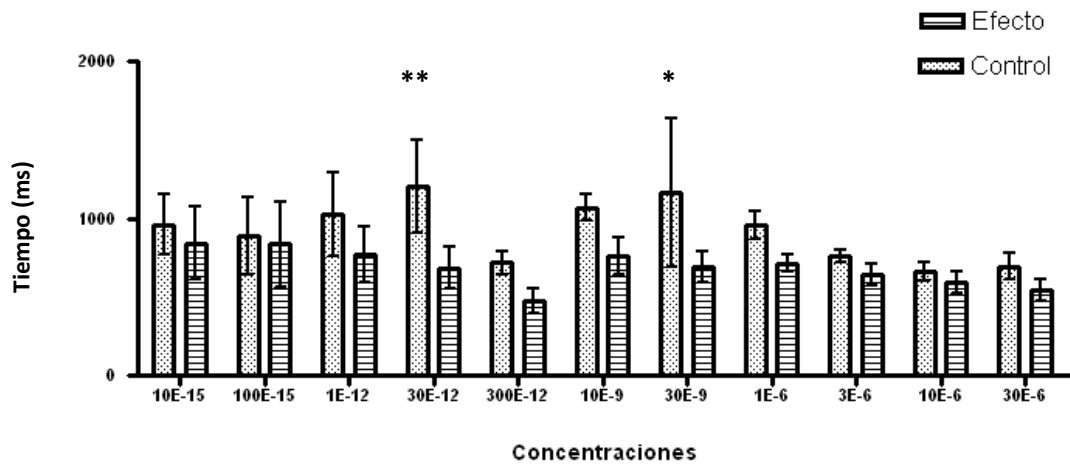


Figura 18. Efecto de la noradrenalina y el estado de desensibilización de la corriente activada por GABA. En la gráfica se muestra el valor medio de las Taus para cada concentración de noradrenalina. Al comparar las medias de cada grupo solo se encontraron diferencias significativas para las concentraciones 30 picomolar y 30 nanomolar* p>0.05, ** p>0.01.

9. DISCUSIÓN

9.1. Caracterización de la corriente activada por GABA

Estudios electrofisiológicos han caracterizado diferentes poblaciones neuronales en los bulbos olfatorios de la rata, describiendo los principales neurotransmisores que participan en sus sinapsis, como glutamato, GABA y noradrenalina (Jia *et al.*, 1999). Por lo anterior y tomando en cuenta las aferentes que reciben, así como el lugar que ocupan las células accesorias-principales dentro del circuito del cual forman parte en el bulbo olfatorio accesorio, se decidió caracterizar la respuesta a GABA y la modulación por noradrenalina sobre dicha corriente.

La naturaleza GABAérgica de las células de la capa celular interna del bulbo olfatorio accesorio, conocida anteriormente como capa granular (pues se pensaba que solo presentaba células granulares) ya había sido descrita por medio de técnicas inmunohistológicas (Takami *et al.*, 1992). Sin embargo, el descubrimiento de poblaciones celulares diferentes a las células granulares en la capa celular interna como las células accesorias-principales sugiere un papel diferente en cuanto a la modulación que pueden ejercer al representar un blanco de convergencia de diferentes aferentes tanto del bulbo olfatorio principal como del propio accesorio (Larriva-Sahd, 2008). Aún así, no existían registros que caracterizaran de manera individual, en las células accesorias-principales disociadas, respuestas a neurotransmisores como GABA.

Los resultados del trabajo aquí presentado caracterizan por primera vez la corriente activada por GABA en células accesorias-principales disociadas, así como también su modulación por noradrenalina. Esta respuesta a GABA sugiere la presencia de receptores a dicho neurotransmisor en este nuevo tipo celular, participando de esta forma en la regulación inhibitoria por parte de las aferentes GABAérgicas presentes en la capa celular interna.

9.2. Bloqueo por bicuculina de la corriente activada por GABA

La composición de las diferentes subunidades del receptor a GABA_A determina la especificidad en cuanto a la función y farmacología del receptor (Fang *et al.*, 2000). En el caso de la respuesta a GABA en las células accesorias-principales del bulbo olfatorio accesorio, ésta es mediada principalmente por el receptor GABA_A, observándose un bloqueo reversible de dicha corriente por la aplicación de bicuculina.

Se ha reportado la participación del receptor GABA_A en la modulación inhibitoria en la capa celular interna del bulbo olfatorio accesorio, específicamente en las células granulares (Araneda y Firestein, 2006). Sin embargo, no existían estudios que observaran el efecto inhibitorio de la bicuculina sobre la corriente activada por GABA en células disociadas de la capa celular interna.

El bloqueo observado en las células accesorias-principales por bicuculina fue parcial, aún cuando la concentración que se utilizó fue mayor que la que ejerce un bloqueo total de la corriente activada por GABA en neuronas estriatales disociadas (Hernández-Echeagaray *et al.*, 2007). Esto puede sugerir diferencias en la afinidad a bicuculina del receptor a GABA_A debidas a diferencias en cuanto al arreglo de subunidades que están presentes en el receptor, o por otra parte, la presencia de receptores GABA_A extrasinápticos que poseen características específicas en cuanto a el arreglo de subunidades que les permiten promover una inhibición tónica a nivel postsináptico, lo que se traduce en una reducción de la sensibilización del receptor (Belelli D *et al.*, 2009).

9.3. Modulación por noradrenalina de la corriente activada por GABA

Desde hace varios años, se sabe que uno de los núcleos con mayor densidad de inervación noradrenérgica por parte del *locus coeruleus* es el bulbo olfatorio, tanto el principal como el accesorio, en especial las células granulares en la capa celular interna

reciben en gran parte dicha inervación (MacLean, 1989). Además, es bien conocido el papel de la noradrenalina como uno de los principales neuromoduladores en la formación de la memoria olfativa en roedores, en especial en los eventos relacionados con la conducta sexual (Brennan *et al.*, 1995).

Dado que la capa celular interna del bulbo olfatorio accesorio posee gran cantidad de neuronas GABAérgicas, y que las células accesorias-principales presentan sinapsis dendodendríticas con las células granulares así como con otras aferentes que actúan modulando estas sinapsis inhibitorias, se decidió estudiar el efecto modulador de la noradrenalina sobre la corriente activada por GABA. El resultado fue que la noradrenalina inhibió las corrientes iónicas activadas por GABA.

En cuanto al mecanismo de modulación por noradrenalina, se sabe que ésta, al igual que la dopamina y la epinefrina, pertenece al grupo de las catecolaminas cuyos receptores están acoplados a proteínas G. Dependiendo del subtipo de receptor que se active, dependerá el tipo de modulación que ejerzan, ya sea que estén acoplados a una proteína G estimulante o inhibidora del AMPc (Siegel *et al.*, 1999). También se sabe que dicha activación de los diferentes subtipos de receptores depende de la concentración del neuromodulador.

En el caso de la noradrenalina, los niveles liberados determinan el tipo de receptor que se activará, por lo que niveles moderados de noradrenalina activan receptores tipo α -2A de alta afinidad acoplados a proteínas G_i que inhiben el AMPc, en tanto que altos niveles de noradrenalina liberados en estados de estrés activan receptores α -1 acoplados a proteínas G_q que activan a la fosfolipasa C y receptores β -1 de baja afinidad acoplados a proteínas G_s que incrementan el AMPc (Arnsten *et al.*, 1994). Por otra parte, también se ha observado que esta activación de receptores es dependiente de la cantidad de dopamina o noradrenalina liberada y presenta un efecto dosis-respuesta en "U" invertida, donde muy poca o demasiada liberación de dichos neurotransmisores provocan alteraciones en algunas funciones de la corteza prefrontal como la memoria de trabajo y procesos de atención (Levy, 2009).

Obedeciendo la cinética anteriormente descrita, se ha observado en experimentos con iontoforesis que en el caso de la dopamina que éstas moderadas concentraciones optimiza las funciones en la corteza prefrontal, esto en presencia de actividad glutamatérgica (Arnsten *et al*, 1994). Registros en rebanadas de ésta misma área han encontrado que la aplicación en el baño de NMDA y dopamina inducen diversos patrones de actividad espaciotemporal en forma de avalanchas neuronales (Steward y Plenz, 2006), que son potenciales de campo negativos locales (nLFP) que al propagarse de forma rápida y aguda se denominan avalanchas neuronales (Beggs y Plenz, 2003). Los nLFP mostraron una respuesta a la concentración de dopamina en forma de “U” invertida, tanto la media del pico de los nLFP así como la sumatoria de todas las amplitudes fueron máximas a concentraciones moderadas de dopamina (30 μ M) y fueron significativamente reducidas a concentraciones mayores o menores a 30 μ M (Steward y Plenz, 2006). Sin embargo, hasta el momento poco se sabe acerca de un comportamiento semejante en respuestas inhibitorias mediadas por receptores a GABA.

Los resultados presentados en este trabajo muestran una inhibición de la corriente activada por GABA, con una cinética dependiente de la concentración de noradrenalina en “U” invertida donde concentraciones pequeñas en el orden femto molar (10×10^{-15}) promueven una inhibición significativa de la corriente activada por GABA, posiblemente por activación de receptores adrenérgicos de alta afinidad α -2A acoplados a una proteína G_i , mientras que concentraciones en el orden de nano molar y pico molar incrementan el efecto inhibitorio sobre la respuesta a GABA presumiblemente por un aumento en la activación de receptores α -2A que son previamente activados por baja amplitud de aplicación iontoforética de NA (Arnsten, 2011); finalmente altas amplitudes de aplicación iontoforética de NA consideradas en el orden micromolar promueven una disminución en la corriente activada por GABA por activación de receptores α -1 y β -1 acoplados a proteínas G_s . En éste último caso donde debido al aumento en la concentración de noradrenalina se activan receptores acoplados a proteínas G estimulantes la modulación negativa del receptor a GABA

puede darse por una vía alterna dependiente de la fosforilación del residuo de serina s409 de la subunidad $\beta 1$ del receptor a GABA (MacDonald *et al.*, 2000).

Estudios inmunocitológicos han mapeado la distribución de los diferentes tipos de subunidades que conforman el receptor GABA_A. En el caso del bulbo olfatorio accesorio mostró la expresión de las subunidades $\alpha 5$, $\alpha 2$ y $\beta 2$, también se encontró presencia de la subunidad $\beta 1$ (Pirker *et al.*, 2000). Esta última subunidad $\beta 1$ al ser fosforilada en el residuo S409 de serina promueve la inhibición de la corriente activada por el receptor GABA_A (MacDonald *et al.*, 2000). Tomando en cuenta los resultados obtenidos de la modulación por noradrenalina de la corriente activada por GABA en las células accesorias-principales se puede sugerir que el efecto inhibitorio en la corriente puede deberse tanto a la activación de diversos receptores a noradrenalina acoplados a proteínas G inhibitoras como estimuladoras, lo que a su vez genera un cinética de tipo "U" invertida. El hecho de que concentraciones desde el orden femtomolar tengan efectos significativos refleja la alta especificidad del control modulador de la noradrenalina en el procesamiento de la información olfativa, misma que en los roedores es importante, no solo en la conducta sexual donde las feromonas determinan diferentes patrones conductuales (Brennan *et al.*, 1995), sino también en procesos de memoria en donde sobre todo la noradrenalina participa modulando el procesamiento de la información en el reconocimiento de sustancias específicas, permitiendo el control y la regulación de diversos procesos hormonales (Brennan y Keverne, 2004). Sin embargo, se necesitan más estudios para corroborar la participación específica de los subtipos de receptores a noradrenalina que están participando en la respuesta inhibitoria de la corriente activada por GABA.

10. CONCLUSIONES

1. Las células accesorias-principales constituyen un tipo neuronal ya que presentan corrientes de sodio y de calcio.
2. Las células accesorias-principales presentan receptores a GABA y noradrenalina, lo que sugiere fuertemente la presencia de aferencias GABAérgicas y noradrenérgicas a esta población neuronal.
3. En la respuesta a GABA en las células accesorias-principales contribuye de forma mayoritaria el receptor GABA_A.
4. La noradrenalina modula negativamente la corriente activada por GABA con una cinética en "U" invertida en las células accesorias-principales.

11. REFERENCIAS

Araneda RC y Firestein S. 2006. Adrenergic enhancement of inhibitory transmission in the accessory olfactory bulb. *J Neurosci.* 26, 3292-3298.

Arnsten AF. 2011. Catecholamine Influences on Dorsolateral Prefrontal Cortical Networks. *Biol Psychiatry.* 69, 89–99.

Arnsten AF, Cai JX, Murphy BL y Goldman-Rakic PS. 1994. Dopamine D1 receptor mechanisms in the cognitive performance of young adult and aged monkeys. *Psychopharmacol.* 116, 143-51.

Belelli D, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Walker MC y Cope DW. 2009. Extrasynaptic GABA_A receptors: form, pharmacology, and function. *J Neurosci.* 29, 12757–12763.

Butler AB y Hodos W. 2005. *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation.* Second edition. New York: Wiley-Liss.

Brennan PA, Kaba H y Keverne EB. 1990. Olfactory recognition: a simple memory system. *Science.* 250, 1223-1226.

Brennan PA y Keverne EB. 2004. Something in the Air? New Insights into Mammalian Pheromones. *Curr Biol.* 14, 81–89.

Brennan PA y Zufall F. 2006. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature.* 444, 308-315.

Brennan PA, Kendriks KM y Kevernet EB. 1995. Neurotransmitter release in the accessory olfactory bulb during and after the formation of an olfactory memory in mice. *Neuroscience.* 69, 1075-1086.

Cheun JE y Yeh HH. 1992. Modulation of GABA_A receptor-activated current by norepinephrine in cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience*. 51, 951-960.

De Castro F. 2009. Wiring olfaction: the cellular and molecular mechanisms that guide the development of synaptic connections from the nose to the cortex. *Front Neurosci*. 4,3:52-69.

Fang L, Qi W, Zdenek BP, Xian-Min Y, Tian W y Hyman BN. 2000. Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and γ -aminobutyric acid A receptors. *Nature*. 403, 274-280.

Flores-Hernández J, Hernandez S, Snyder GL, Yan Z, Fienberg AA, Moss SJ, Greengard P y Surmeier DJ. 2000. D1 dopamine receptor activation reduces GABA_(A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *J Neurophysiol*. 83, 2996-3004.

Flores-Hernández J, Cepeda C, Hernandez-Echegaray E, Calvert CR, Jokel ES, Fienberg AA, Greengard P y Levine MS. 2002. Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol*. 88, 3010-3020.

Goldmakher GV y Moss RL. 2000. A subset of periglomerular neurons in the rat accessory olfactory bulb 1 may be excited by GABA through a Na⁺-dependent mechanism. *Brain Res*. 871, 7-15.

Halpen M y Martinez-Marcos. 2003. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol*. 70, 245-318.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B y Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85-100.

Hayashi Y, Momiyama A, Takahashi T, Ohishi H, Ogawa-Meguro R, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. 1993. Role of a metabotropic glutamate receptor in synaptic modulation in the accessory olfactory bulb. *Nature.* 366, 687-690.

Hartmann K, Stief F, Draguhn A y Frahma C. 2004. Ionotropic GABA receptors with mixed pharmacological properties of GABAA and GABAC receptors. *Eur J Pharmacol.* 497, 139-146.

Hernández-Echeagaray E, Cepeda C, Ariano AA, Lobo MK, Sibley DR y Levine MS. 2007. Dopamine reduction of GABA currents in striatal medium-sized spiny neurons is mediated principally by the D1 receptor subtype. *Neurochem Res.* 32, 229-240.

Hille B. 1991. Ion channels of excitable membranes. Second Edition. United States. Sinaur Associates Inc.

Isaacson JS y Strowbridge BW. 1998. Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. *Neuron.* 20, 749-761.

Jia C, Chen WR y Shepherd GM. 1999. Synaptic organization and neurotransmitters in the rat accessory olfactory bulb. *J Neurophysiol.* 81, 345-55.

Larriva-Sahd J. 2008. The Accessory olfactory bulb in the adult rat: a cytological study of its cell types, neuropil, neuronal modules, and interactions with the main olfactory system. *J Comp Neurol.* 510, 309-350.

Levy F. 2009. Dopamine vs noradrenaline: inverted-U effects and ADHD theories. *Aust N Z J Psychiatry.* 43:101-108

MacDonald LR y Twyman RE. 2000. Biophysical properties and regulation of GABA_A receptor channels. *Semin Neurosci.* 3, 219-235.

McLean HJ, Shipley TM, Nickell TM, Aston-Jones G, Christian KH y Reyher CG. 1989. Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *J Comp Neurol.* 285, 339-349.

Macrides F y Schneider SP. 1982. Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster. *J Comp Neurol.* 208, 419-430.

Mark D, Eyre MD, Antal M y Nusser Z. 2008. Distinct deep short-axon cell subtypes of the main olfactory bulb provide novel intrabulbar and extrabulbar GABAergic connections. *J Neurosci.* 33, 8217-8229.

Nai Q, Dong WH, Lincester C y Ennis M. 2010. Activation of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ Noradrenergic receptors exert opposing effects on excitability on main olfactory bulb granule cells. *Neuroscience.* 169, 882-892.

Paxinos G. 1995. *The Rat Nervous System. Second Edition.* United States. Academic Press.

Pirker S, Schwarzer C, Weselthaler y Sieghart W. 2000. GABA_A receptors immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience.* 101, 815-850.

Pressler TR y Strowbridge WB. 2006. Blanes Cells Mediate Persistent Feedforward Inhibition onto Granule Cells in the Olfactory Bulb. *Neuron.* 49, 889-904.

Siegel GJ, Agranoff BW y Albers RW. 1999. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven

Song C, y Leonard BE. 2005. The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *NeurosciBiobehav Rev.* 29, 627-647.

Takami S, Fernández DG y Graziadei PPC. 1992. The morphology of GABA-immunoreactive neurons in the rat accessory olfactory bulb of rats. *Brain Res.* 588,317-323.

Trombley PQ y Shepherd GM. 1992. Noradrenergic inhibition of synaptic transmission between mitral and granule cells in mammalian olfactory bulb cultures. *J Neurosci.* 12, 3985-3991.

12. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema general de las conexiones del sistema olfatorio principal y accesorio.....	9
Figura 2. Vista sagital del cerebro de rata indicando La ubicación del bulbo olfatorio accesorio.....	11
Figura 3. Corte sagital del bulbo olfatorio accesorio d rata Indicando las capas que lo conforman.....	12
Figura 4. Células accesorias principales.....	14
Figura 5. Circuito de comunicación entre el bulbo Olfatorio principal y accesorio.....	15
Figura 6. Aplicación de bicuculina sobre la corriente inducida por GABA en células periglomerulares.....	16
Figura 7. Incremento en la frecuencia de los IPSC GABAérgicos miniatura.....	17
Figura 8. Células de Blanes.....	18
Figura 9. Areadisectada del bulbo olfatorio	26
Figura 10. Células del bulbo olfatorio accesorio de rata.....	27
Figura 11. Corrientes de Na ⁺ y Ca ²⁺ en células accesorias-principales.....	29
Figura 12. Registro representativo de la corriente activada por GABA en células accesorias principales.....	30
Figura 13. Efecto de la bicuculina sobre la corriente activada por GABA en células accesorias principales.....	31
Figura 14. Relación entre la concentración de GABA	

y la corriente iónica.....	32
Figura 15. Bloqueo por noradrenalina de la corriente activada por GABA.....	33
Figura 16. Bloqueo de la corriente activada por GABA con bajas concentraciones de noradrenalina.....	34
Figura 17. Bloqueo de la corriente activada por GABA por noradrenalina en células accesorias principales.....	35
Figura 18. Efecto de la co-aplicación de noradrenalina y GABA sobre la corriente activada por GABA en células accesorias principales.....	36
Tabla 1. Parámetros electrofisiológicos en células accesorias principales.....	28