



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLÓGÍA

**DISTRIBUCIÓN DE LAS AFERENCIAS OLFATORIAS E INTRÍNSECAS EN LA CORTEZA
PIRIFORME**

Tesis que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias (Neurobiología)

presenta

Biol. Victor Manuel Vargas Barroso

Director de Tesis

Dr. Jorge Larriva Sahd

Campus Juriquilla, Querétaro. Junio 2012



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.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Victor Manuel Vargas Barroso, cuyo título es: “Distribución de las aferencias olfatorias e intrínsecas en la corteza piriforme” 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

Presidente

Dr. _____

Secretario (Tutor)

Dr. _____

Vocal

Dr. _____

Suplente

Dr. _____

Suplente

Dr. _____

Aprobado por el comité académico

Coordinador del programa

A pesar de que las aferencias sensoriales -provenientes del bulbo olfatorio (BO) establecen contactos sinápticos en áreas específicas de la corteza piriforme (CP), no existen estudios sistemáticos enfocados a llevar a cabo la caracterización de los sitios exactos de terminación de las fibras sobre las distintas regiones de la neurona piramidal de la CP. Desde los primeros estudios de Ramón y Cajal y de Calleja surgió la noción de que las fibras colaterales emitidas por el tracto olfatorio lateral (TOL), cuyo origen son las neuronas mitrales y empenachadas del BO establecen contactos sinápticos exclusivamente en la capa Ia de CP. Posteriormente, se llevaron a cabo estudios que confirmaron esta idea mediante el uso de isótopos radioactivos transportados de manera anterógrada. El presente trabajo aborda a nivel de microscopía electrónica (ME) la distribución topográfica de las aferencias olfatorias en la CP, de manera complementaria se analizaron las aferencias intrínsecas inmunoreactivas al neurotransmisor GABA. Se encontró que las aferencias del BO no terminan exclusivamente en las regiones superficiales de la CP, sino que lo hacen en regiones profundas (II) y se encuentran asociadas a somas y dendritas proximales. Al respecto de las aferencias intrínsecas se encontró un patrón de terminación en diáfisis dendríticas de procesos inmunoreactivos a GABA y se confirmó la presencia de contactos sinápticos axo-axónicos en la CP. La evidencia anatómica aquí obtenida implica un esquema de conectividad novedoso con relación a las aferencias sensoriales recibidas por la CP; por lo tanto es necesario también incorporar este concepto (las aferencias sensoriales en la CP no están restringidas a la primera capa) cuando se llevan a cabo estudios electrofisiológicos que intentan aportar conocimiento acerca del procesamiento de información en dicha corteza.

Although sensory afferences originating in the olfactory bulb (OB) establish specific patterns of termination in the pyriform cortex (PC), the exact topographic distribution of these fibers provided by mitral and tufted neurons to pyramidal neurons in the PC is not known. It has been accepted since Ramón y Cajal and Calleja studies that collateral fibers emanating from the lateral olfactory tract (LOT) restrict their synapses to the superficial half of layer I, especially to layer Ia. Studies using radioisotopes anterogradely transported by principal neurons of the OB confirmed this idea at the light microscopy level. The present study addresses the distribution of olfactory fibers in the PC at the electron microscope (EM) level, also it was addressed the distribution of GABA immunoreactive processes. The results obtained indicate that mitral and tufted axons originating in the OB go deeper than previously thought, they were found in association with proximal dendrites and somata in layer II of PC, whereas immunoreactive GABAergic processes were found to distribute mainly on dendritic shafts. It was further confirmed the presence of axo-axonic synapses previously reported in the PC. The anatomical evidence provided by this study implies a different pattern of connectivity regarding the sensory afferences established in the PC, hence it should be necessary to take into account this concept (sensory afferences in the PC are not restricted to the most superficial layer) when electrophysiological studies intended to apport knowlegde on the processing of the PC are done.

AGRADECIMIENTOS

IV

Agradezco el apoyo recibido por el grupo de trabajo del Dr. Paredes, por amablemente permitirme usar equipo de su laboratorio y prestármelo sin restricción alguna. Específicamente agradezco a Edwards Antonio Cabrera por enseñarme a llevar a cabo lesiones usando el estereotáxico, sin su ayuda no hubiera podido hacer mucho; también agradezco a Francisco Camacho por prestarme material necesario para las cirugías.

Agradezco a todos los profesores que me dieron clases durante la maestría, pues su docencia fue muy formativa para mí, también quiero agradecer el apoyo y los consejos brindados por mi comité tutelar, conformado por el Dr. Alfredo Varela y el Dr. Raúl Paredes, además del Dr. Larriva, quién es mi tutor.

De igual forma expreso mi gratitud hacia el Dr. Jorge Larriva-Sahd, primero por aceptarme en su laboratorio, y después, pero no menos importante, por siempre tener una gran disponibilidad conmigo en todos los sentidos, para hablar, para responderme dudas, para prestarme libros, artículos de investigación etc.. y por guiarme en este camino. También agradezco el apoyo técnico y los consejos de la M. en C. Gema Martínez Cabrera.

Agradezco profundamente la orientación de la M. en C. Leonor Casanova Rico, pero agradezco y valoro aún más la excelente disposición y trato hacia mi persona.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada
Becario no. 289638

A la dirección general de estudios de posgrado de la UNAM
Becario no. (número de cuenta): 511007011

Poroyecto financiado por: PAPIIT IN206511

Unidad de microscopía:

Agradezco a Lourdes Palma por la coordinación y apoyo en el uso del microscopio electrónico.

Bioterio:

V

Agradezco al M.V.Z. Martín García Servín y a todos los trabajadores del bioterio por proporcionarme animales y por cuidar a los mismos.

DEDICATORIAS

VI

Dedico este trabajo a mi familia; mis padres Mario y Tere y mi hermano Mario, quienes me apoyan siempre incondicionalmente. A mis abuelos, los que aún están: Escelita, Manuel y Evelia y a mi abuelo Vicente que ya se nos adelantó.

También dedico mi trabajo a Arafat, quien ha sido mi compañera en las buenas y en las malas y mi mejor amiga, mi inspiración y motivación para seguir adelante. Sin ti no estaría aquí, GRACIAS.

Dedico este trabajo a mis amigos, que son mi otra familia, mis compas con los que he crecido y vivido muchas cosas memorables, los que me recuerdan que la vida no es nada más estudio y neurociencias, los que me aceptan y conocen por quién soy en verdad.

• Resumen.....	II
• Summary.....	III
• Agradecimientos.....	IV-V
• Dedicatorias.....	VI
• Índice.....	VII
• Introducción.....	1
• Antecedentes.....	4
• Justificación.....	26
• Hipótesis.....	27
• Objetivos.....	27
• Material y métodos.....	28
• Resultados.....	33
• Discusión.....	46
• Conclusiones.....	54
• Referencias.....	55
• Lista de figuras.....	60

I. Introducción

Los procesos evolutivos que actúan sobre los seres vivos han generado mecanismos eficientes de interacción con el ambiente. Dicha interacción es llevada a cabo por modalidades sensoriales de distinta naturaleza que le permiten al individuo corresponder su conducta con un contexto ecológico cambiante, es decir, adaptarse al mismo. Una de estas modalidades sensoriales es la percepción de moléculas odoríferas, que le otorgan a los organismos la posibilidad de crear una representación –parcial- interna del mundo externo (aromas que se encuentran en su entorno) (Lledo et al. 2005). Las moléculas odoríferas son detectadas a través del sentido del olfato, y la representación de las mismas (estímulo) se construye en la(s) estructura cerebral denominada corteza olfativa primaria.

Tradicionalmente, todas aquellas regiones que reciben aferencias directas del bulbo olfatorio (BO) a través del tracto olfatorio lateral (TOL) han sido denominadas como corteza(s) olfativa “primaria”, como lo son el núcleo olfatorio anterior (NOA), el tubérculo olfatorio (TO), la corteza piriforme (CP), la amígdala (Am) y la corteza entorinal (CE) (Fig. 1). Es en estas áreas cerebrales -pero en especial en la CP- en donde la información procedente de estímulos odoríferos será procesada y enviada a otras estructuras corticales -corteza orbitofrontal (COF)- en donde ocurrirá la percepción y la discriminación de los olores de manera consciente (Buck, 1996).

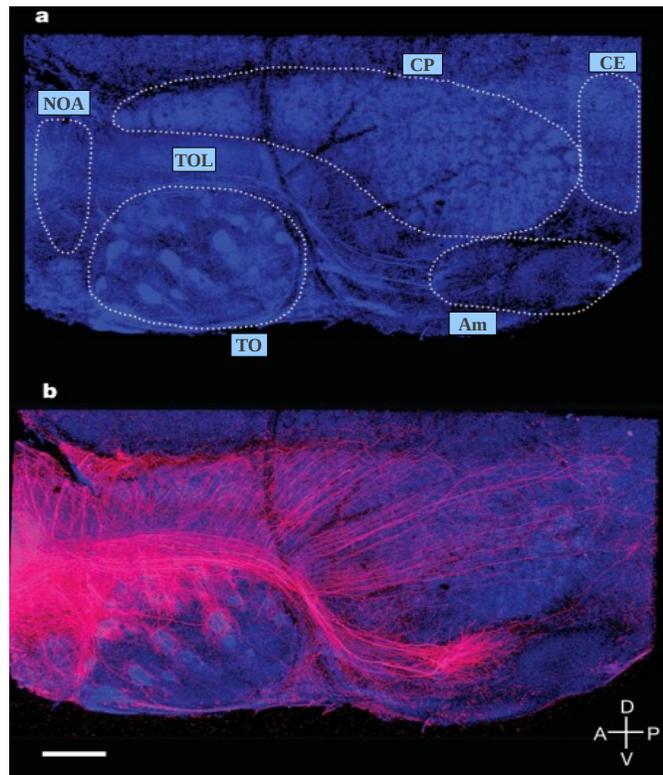


Figura 1. Áreas cerebrales que reciben aferencias del BO. **a.** Preparación de “cerebro aplanado” de ratón en orientación sagital, se encuentran delimitadas las áreas que reciben proyecciones del BO, éstas son, NOA, TO, CP, Am y CE. **b.** Distribución de las fibras contenidas en el TOL en las regiones delimitadas en a; barra de medida: 700 μm . La cruz abajo a la derecha señala la ubicación de las estructuras señaladas con respecto a los ejes corporales: Anterior, Posterior, Ventral y Dorsal. Modificado de (Sosulski et. al 2011).

Además, estudios morfológicos han demostrado que la CP proyecta a diversas estructuras que están involucradas en la integración de estímulos sensoriales para la emisión de respuestas conductuales (corteza prefrontal), en la asignación de características emocionales o motivacionales al estímulo (Am) y en el establecimiento de una memoria asociada al mismo (hipocampo) (Haberly, 2001).

El sistema olfativo procesa estímulos odoríferos por medio de un órgano sensorial denominado “neuroepitelio olfativo o nasal”. Dentro de este epitelio se encuentran alineadas las células sensoriales que se encargan de transducir (convertir un tipo de energía en otro) el estímulo odorífero. El proceso de transducción comienza cuando una molécula odorífera se une a 1 de ~1000 receptores posibles (Buck y Axel, 1991).

El receptor se encuentra en la superficie membranal de los cilios del proceso periférico (dendrita) de la célula, mientras que el proceso central (axón) proyecta a regiones circunscritas dentro del BO denominadas glomérulos; cuya estructura consiste de un neuropilo que contiene dendritas apicales de neuronas mitrales y empenachadas, interneuronas y los procesos centrales de células sensoriales. Estas últimas, se concentran en el techo de la cavidad nasal y conllevan impulsos excitatorios a las células mitrales y empenachadas, las que a su vez, formando el TOL conducirán la información a las áreas corticales olfativas (p. ej. CP) (Mori et al. 1999).

La información detectada por medio del sentido del olfato puede tener efectos importantes sobre la conducta del animal y su supervivencia. Prueba de ello es que Mandiyan et al. (2005) demostraron que los ratones a los que se les remueve el BO y/o que no presentan el canal catiónico activado por nucleótidos cíclicos CNGA2 presente en células sensoriales del epitelio olfatorio (EO), son incapaces de generar conductas reproductivas o de agresividad y defensa, lo que sugiere que la conducta reproductiva está asociada al procesamiento odorífero e incluso muestra cierta dependencia ante la entrada sensorial (olfato) para generar conductas biológicamente relevantes.

Mas aún, se han obtenido evidencias experimentales de que la remoción del gen que codifica para la proteína *Golf* -que activa a la enzima adenilato ciclasa y por consiguiente eleva los niveles de AMPc- provoca una respuesta electrofisiológica disminuida ante los odorantes presentados, esta característica es complementada con conductas que reflejan un estado anósmico en el animal mutante. Por otro lado, la mayoría de los homocigotos (*Golf* -/-) muere a las 2 semanas de edad debido a que no son capaces de succionar, el bajo porcentaje que sobrevive presenta hiperactividad y las hembras que se reproducen despliegan conductas maternas alteradas (Belluscio et al. 1998).

Evidencia bioquímica y genética revela que la elevación en los niveles de AMPc es muy importante para la transducción de los estímulos olfativos, mientras que el papel que juega el aumento en los niveles de IP3 -en vertebrados- es en gran medida desconocido, pero la observación de que los olores que no producen aumento en la [AMPc] en cilios aislados, si elevan los niveles de IP3 podría sugerir que diferentes olores actúan a través de distintos segundos mensajeros (Belluscio et al. 1998).

Este estudio fue planteado con el objetivo de obtener información acerca del sitio de terminación de las aferencias que recibe la neurona piramidal de la CP, de manera particular fueron estudiadas las aferencias emanadas del BO y de la propia CP (neuronas GABAérgicas). La identificación de los sitios de terminación (sinapsis) se llevó a cabo mediante el uso del microscopio electrónico (ME). Para poder visualizar las aferencias procedentes del BO se generó una lesión electrolítica en la capa mitral del mismo, cuyo producto fue una degeneración conspicua de las terminales de dichas neuronas (mitrales y/ empenachadas) que fueron identificadas en la CP. Así mismo, el tejido de CP fue sometido a un procedimiento de inmunohistoquímica para determinar la distribución topográfica de las terminales inmunoreactivas al neurotransmisor GABA (ácido- γ -amino-butírico) sobre la neurona piramidal de la CP.

II. Antecedentes

1. Corteza Piriforme (Estructura)

1.1 Descripción

El BO de especies macrosmáticas fue de las primeras áreas corticales estudiadas por los neuroanatomistas clásicos. Camilo Golgi realizó el primer dibujo descriptivo del BO con la técnica de Golgi, mientras que Santiago Ramón y Cajal demostró que existía un control de fibras centrífugas sobre las células mitrales (Larriva-Sahd, 2008). Además, también se llevaron a cabo estudios descriptivos generales de la vía olfatoria en los vertebrados (Calleja, 1893).

Posteriormente, O'Leary (1936) publicó un trabajo sobre la estructura de la corteza olfatoria primaria, en el que describe la organización de las capas y los tipos neuronales, e incluso dedica una porción significativa del trabajo a la caracterización de las neuronas de axón corto (interneuronas) y a la descripción de los plexos axonales. Además sugiere algunas formas de interacción entre las neuronas observadas por él, infiriendo así un modelo funcional basado en observaciones anatómicas.

En años subsiguientes los estudios de la corteza olfatoria primaria incidieron principalmente sobre la caracterización de las vías de comunicación dentro y fuera de ésta, es decir, se obtuvieron datos que aportaron conocimiento sobre el flujo de la información olfatoria en el cerebro y de la relación que existe entre las estructuras que participan en dicho proceso, de tal forma que por medio de experimentos de autoradiografía y de inyección de trazadores retrógrados y anterógrados, los elementos centrales que concatenan la vía olfatoria quedaron establecidos.

Destacan los trabajos de Price (1973), Luskin y Price, (1983a, 1983b), Haberly y Price (1978) y la monografía de Facundo Valverde (1965) que recopila sus observaciones del lóbulo piriforme hechas en preparaciones de Golgi. En estos trabajos, se observó que hay patrones de terminación de fibras aferentes que se distribuyen de manera alternada y complementaria en las capas. Por ejemplo, en el TO, NOA, CP, y Am las fibras provenientes del BO se alojan en la capa Ia, mientras que las fibras procedentes de otras áreas corticales (asociación) se alojan en la capa Ib

(Price, 1973).

El mismo autor también caracterizó los sitios de terminación de fibras intracorticales, en donde se observan dos grandes contingentes con patrones distintos de terminación. El primer contingente se origina en el NOA, la CP y el área lateral entorinal, y sus fibras se alojan predominantemente en la capa Ib y III, mientras que el segundo contingente se origina en la corteza dorsal peduncular (CDP), tenia tecta ventral (TTV) y la corteza periamigdalóide, y sus fibras establecen contactos con las células de la capa II (Luskin y Price, 1983b).

Por otro lado, se determinó al menos uno de los sitios de origen de las fibras centrífugas que ejercen control sobre el bulbo olfatorio y los sitios de terminación de las mismas. Por medio de lesiones electrolíticas se observó (Price, 1969) que el sitio de origen de estas fibras es el núcleo del brazo horizontal de la banda diagonal, que a su vez recibe fibras provenientes del hipotálamo; mientras que el sitio de terminación de las fibras que emanan del mismo núcleo, es en la capa plexiforme externa del BO (Price, 1968).

1.2 Descripción de las capas celulares

Las áreas corticales que reciben aferencias del BO están compuestas principalmente por células piramidales y poseen tres capas (a excepción de la CE): La más superficial (I) es una capa plexiforme que contiene las dendritas apicales de células piramidales, plexos axonales y pocas somas neuronales (Fig. 2a). Esta capa ha sido dividida en dos regiones en función de las aferencias que recibe, una superficial (Ia) -aferencias del BO- y otra profunda (Ib) -aferencias de otras zonas corticales (asociación)- (Price, 1973).

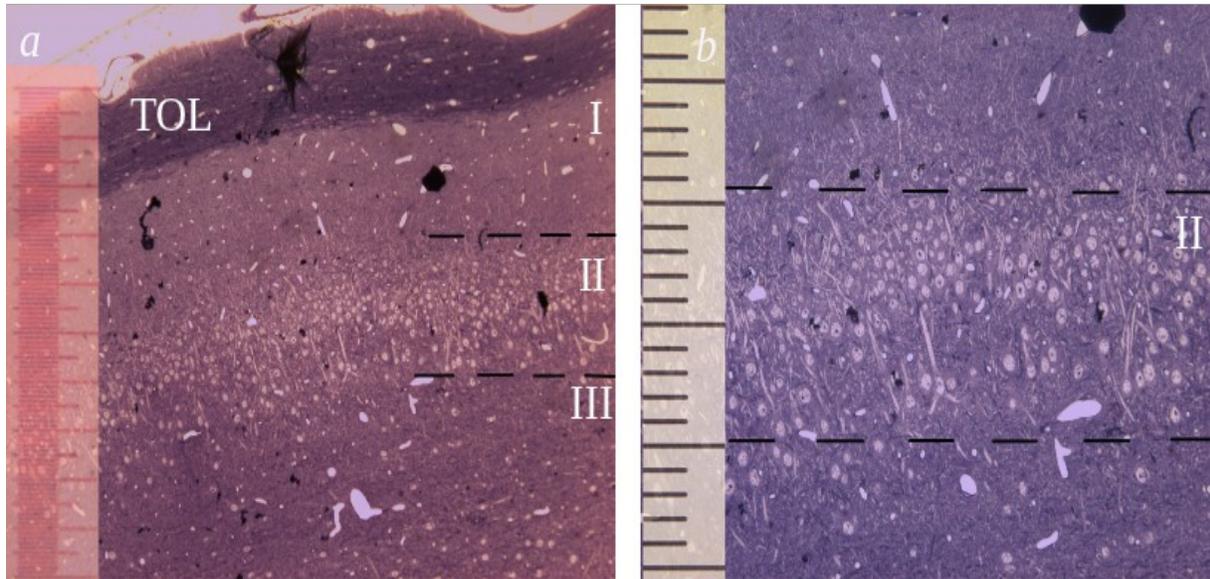


Figura 2. a. Tinción de toluidina obtenida durante el estudio donde se muestra la organización laminar de la CP; el TOL, la capa I (plexiforme), II (piramidal) y III (polimórfica). Escala de medida: 1mm. **b.** Tinción de toluidina donde se observa la capa II de la CP densamente poblada de cuerpos neuronales. Escala de medida: 230 μm (cortes semi-finos sagitales).

La segunda capa (II) (Fig. 2b) está compuesta por células piramidales densamente empaquetadas que en algunas regiones presenta una subdivisión (IIa) que aloja otra población de células principales denominadas semilunares (SL), mientras que en la región más profunda de la segunda capa (IIb) se ubican los somas de las células piramidales superficiales (PS) (Haberly y Price 1978).

Por último, en la tercera capa (III) (Fig. 2b) se puede observar una variedad de células polimórficas con un gradiente estructural que va de superficial a profundo, de tal forma que en la porción superficial se ubican células piramidales profundas (PP) y pocas células multipolares, mientras que en la región profunda de la capa III se encuentra una mayor densidad de células multipolares e intrínsecas (interneuronas) y pocas células PP's (Haberly y Price 1978). En todas las áreas el sistema eferente lo constituyen las células piramidales -y en menor proporción las semilunares- y también existe una gran variedad de células de axón corto o interneuronas (O'Leary, 1936).

2. **Procesamiento de estímulos olfativos (Función)**

2.1 Percepción de moléculas odoríferas (Bulbo Olfatorio)

Comprender el fenómeno de la percepción de los odorantes que se encuentran en el ambiente supone un importante problema en cuanto a su procesamiento (codificación) dentro del SNC, pues a diferencia de otras modalidades sensoriales los estímulos no son representados en correspondencia con su ubicación en el espacio (visión y somatosensorial), ni son conducidos de manera ordenada a lo largo de toda la vía anatómica (audición) (Stettler y Axel, 2009). En otras palabras, los olores no tienen un orden determinado en el espacio, por lo que la percepción de los mismos generada en el SNC, está lejos de ser bien entendida.

La entrada sensorial al sistema olfativo está mediada por moléculas odoríferas que representan un enorme rango variable de estructuras. Para poder lidiar con dicha variabilidad de moléculas odoríferas, los mamíferos han desarrollado (por medio de proceso evolutivos) una gran diversidad de receptores (~1000) (Buck y Axel, 1991) que se expresan en la superficie membranal de los cilios de las células sensoriales del EO. La información es conducida al SNC por medio de los axones (o procesos centrales) de las células sensoriales, y es procesada e integrada como la cualidad olfativa de los objetos.

En el BO existe una segregación en las proyecciones que provienen del EO y hasta hace poco se afirmaba que todas las células sensoriales que expresan un mismo receptor convergen en uno o dos glomérulos (Mombaerts et al. 1996), sin embargo, se ha demostrado que un mismo glomérulo puede recibir aferencias de células que expresen receptores distintos, siempre y cuando el ligando de estos receptores sea similar en su estructura molecular, por lo que a esta característica se le asignó el nombre de rango receptivo molecular (RRM). Dicho de otra forma, el RRM de los glomérulos en el BO se refiere al conjunto de moléculas que comparten características estructurales como la estereo-química de la cadena de carbonos, el tipo y la posición del grupo funcional adherido y que pueden ser detectadas por módulos glomerulares segregados espacialmente (Mori et al. 1992).

Por lo anterior, se sugiere que los módulos glomerulares pueden ser conceptualizados como unidades de detección o extracción de características moleculares, y es posible que, debido a que un odorante normalmente presenta más de una característica molecular diferente, la información sea procesada en base a un patrón de actividad espacial en el BO. El patrón de actividad espacial es generado también en las neuronas mitrales y/o empenachadas que envían sus dendritas apicales a los módulos glomerulares correspondientes.

Dicho patrón de actividad espacial sería entonces conducido a la CP para que en ella se genere una representación unificada de los distintos componentes moleculares que integran un odorante. De tal forma que si dos células mitrales y/o empenachadas que envían sus dendritas apicales a módulos glomerulares con distintos RRM's convergen en la misma neurona de la CP, la actividad de la neurona cortical representaría la combinación de dos características moleculares que pudieran ser parte de un olor particular (Mori et al. 1999).

En apoyo a lo mencionado previamente, se ha observado que la inhalación de moléculas odoríferas provoca en el BO una oscilación en los potenciales locales de campo (PLC) de 30 a 80 Hz, lo que sugiere que la generación de potenciales de acción por parte de las neuronas mitrales y/o empenachadas se lleva a cabo de manera sincrónica, esto sería mediado por las conexiones dendro-dendríticas presentes entre neuronas granulares (de naturaleza GABAérgica) y neuronas mitrales y/o empenachadas. Finalmente, la sincronización en la descarga de las células eferentes del BO contribuiría a facilitar la activación de las neuronas corticales del área olfativa (Mori et al. 1999).

2.2 Percepción de moléculas odoríferas (Corteza Piriforme)

Como se ha mencionado anteriormente, la representación de moléculas odoríferas en la CP no se lleva a cabo mediante una correspondencia espacial en cada uno de los relevos de la vía hasta llegar a las cortezas primarias (somatosensorial, auditiva y visual), además el sistema olfativo es la única modalidad sensorial que no requiere de un relevo sináptico en el tálamo antes de llegar a la corteza primaria correspondiente; estas características distinguen al sistema olfativo en general

y a la CP en particular del procesamiento canónico que se lleva a cabo en otros sistemas sensoriales.

Por otro lado, la CP presenta dos características que le otorgan un menor grado de complejidad y por lo tanto resulta ser un buen modelo para llevar a cabo estudios de procesamiento cortical. La primera característica es que, como ya se ha mencionado, la CP es una paleocorteza filogenéticamente antigua cuya organización celular es más simple, ya que solo presenta tres capas, mientras que las isocortezas (neocorteza) contienen seis capas (Brodal, 1980). Esta relativa simplicidad evidentemente implica un nivel de procesamiento de menor complejidad, sin embargo, no se descarta que de ella se pueda obtener información valiosa que sugiera principios generales de procesamiento cortical (Suzuki y Bekkers, 2006).

La segunda característica es que la información sensorial se conduce a la CP desde el órgano receptor a través de solamente dos sinapsis (células sensoriales a neuronas mitrales y/o empenachadas y neuronas mitrales y/o empenachadas a neuronas principales de CP). De tal forma que la estructura anatómica de esta modalidad sensorial es relativamente sencilla y solo requiere del procesamiento local que ocurre en el BO para llegar a la CP, mientras que en las otras modalidades sensoriales la información es “filtrada” por el tálamo, lo que indudablemente le confiere al procesamiento de dichas modalidades un nivel de complejidad mayor (Suzuki y Bekkers, 2006).

La CP es también un buen modelo para llevar a cabo estudios de memoria, ya que los estímulos olfativos tienen acceso al hipocampo a través de la CE y se ha observado que la CP participa en procesos asociativos durante el aprendizaje (Zinyuk et al. 2001). Además se han obtenido resultados que demuestran que en las ratas al llevar a cabo una tarea de discriminación olfativa, la actividad de células piramidales en CP no solo representa o construye la cualidad de los odorantes, sino que también está relacionada a la información contextual de experiencias previas y toma de decisiones. Estos datos fueron obtenidos al registrar la actividad extracelular en CP y COF, por lo que se infiere que las conexiones entre CP y COF subyacen al procesamiento arriba mencionado (Schoenbaum y Eichenbaum, 1995).

Este estudio se efectuó en la CP por el motivo de que es la mayor área cortical olfativa y por ende recibe una proporción mayor de aferencias provenientes del BO en relación con las otras regiones de la corteza “olfativa primaria” (Zinyuk et al. 2001), por ello se hará una breve revisión de los estudios relevantes que intentan aportar información acerca de la participación de dicha estructura en el procesamiento de los estímulos olfativos.

En la década de los 80, Ojima (1984) realizó inyecciones intracelulares de peroxidasa de rábano (HRP) en el BO con la finalidad de poder observar la trayectoria y el patrón de “arborización” de los axones de las células mitrales y empenachadas en las áreas olfativas a las que proyecta. Los resultados mostraron que la mayoría de las células mitrales inyectadas conducen sus axones al NOA y a la CP, mientras que solo una cuarta parte de ellas proyecta al TO; se observó de manera consistente que el axón principal (contenido en el TOL) emite delgadas fibras colaterales a lo largo de su curso y éstas se distribuyen de manera heterogénea en “parches” elongados en el eje antero-posterior.

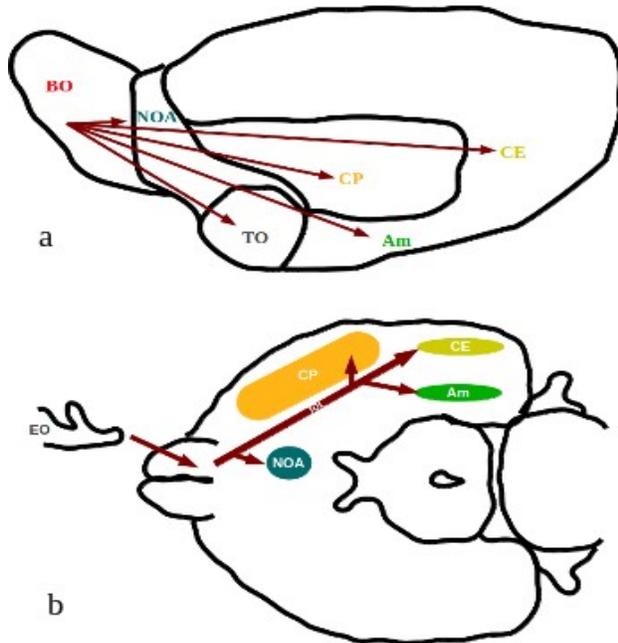


Figura 3. Dibujo representativo de las regiones olfativas del roedor en vista sagital (a) y ventral (b). Epitelio olfativo (EO), bulbo olfatorio (BO), núcleo olfatorio anterior (NOA), corteza piriforme (CP), tubérculo olfatorio (TO), corteza entorinal (CE) y Amígdala (Am).

Por otro lado, se observó una correspondencia entre el sitio de inyección en el BO y la distribución del axón en el NOA, lo que sugiere una organización topográfica. En contraste, dicha organización no fue detectada en las proyecciones a la CP. Las estructuras mencionadas en este párrafo se muestran en la figura 3.

En años más recientes, la distribución de las aferencias provenientes del BO han sido estudiadas con la aplicación de trazadores retrógrados y anterógrados. Tras inyectar en regiones dorsales y

ventrales del BO la lectina *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), se observaron axones cuyas ramificaciones (fibras colaterales) se distribuyen en regiones telencefálicas como la corteza piriforme anterior (CPa), corteza piriforme posterior (CPp), CE y Am (Kang et al. 2011).

De manera particular, en este estudio se demostró que las células principales del BO proyectan al núcleo medial de la amígdala (MeA), previamente identificado como región eferente del bulbo olfatorio accesorio (BOA). Además se determinó que las fibras colaterales de un mismo axón se distribuyen tanto en CPa como en CPp, lo que sugiere que las dos estructuras pueden acceder a la información transmitida por un mismo axón. Finalmente, se observó que las otras regiones de la amígdala que reciben aferencias del BO son el núcleo cortical anterior (ACo) y el núcleo cortical postero-lateral (PLCo), mientras que el núcleo cortical postero-medial (PMCo) no recibe aferencias provenientes del BO (Kang et al. 2011).

La representación de olores en la CP ha sido estudiada con registros electrofisiológicos, imagenología de señales intrínsecas (p. ej. calcio) y por medio del estudio de genes de expresión inmediata (*Fos*, *Arc*) activados por estímulos odoríferos (Illig y Haberly, 2003; Poo e Isaacson, 2009; Rennaker et al. 2007). En dichos estudios se han registrado células piramidales individuales en diversas regiones de la CPa, y se han obtenido datos que muestran que un odorante particular recluta células piramidales dispersas a lo largo de la corteza y que una neurona piramidal puede activarse ante diversos odorantes (Rennaker et al. 2007).

Por otro lado, Poo e Isaacson (2009) han demostrado que la actividad evocada por estímulos olfativos en la CPa es amplia y distribuida; además observaron que al presentar odorantes mono-moleculares el porcentaje de células que se activa es generalmente alrededor del 10%. Más aún, reportaron que en dicha región emerge un mecanismo de “inhibición global” gracias a que las interneuronas de la CP reciben una mayor cantidad de aferencias provenientes del BO que las neuronas principales de las capas II/III.

De tal forma que la estimulación del TOL produce más potenciales excitatorios post-sinápticos (PEPS) en interneuronas y solamente las neuronas principales que reciben fuertes y/o preferentes

estímulos excitatorios son activadas. Por último, los autores describen una oscilación en la actividad sináptica de la CPa (15-30 Hz) observada a través de PLC; la “inhibición global” (interneuronas reciben estímulos excitatorios de manera coordinada) ocurre en fase con los PLC, por lo que en la CPa se genera una pequeña ventana temporal que restringe la actividad de las células excitatorias (eferentes) (Poo e Isaacson, 2009).

Por medio de imagenología de fluoróforos sensibles a la concentración de calcio intracelular, Stettler y Axel (2009) observaron que las respuestas de la CP a la estimulación olfativa se organizan de una manera ampliamente distribuida y que un odorante es representado por un ensamble único -pero disperso- de neuronas piramidales, cada neurona puede formar parte de ensambles que representen olores con características diferentes y las neuronas que responden a determinados odorantes están distribuidas sin una preferencia espacial observable, por lo que existen neuronas contiguas con campos receptivos disímiles. Los estudios hechos con el patrón de expresión del gen *Fos* han llegado básicamente a la misma conclusión, en donde se demuestra que las células que son activadas en respuesta a un odorante están distribuidas a lo largo de la corteza sin ningún patrón o arreglo espacial particular (Illig y Haberly, 2003).

Sin embargo, los patrones de actividad neuronal no permiten discernir si las proyecciones axonales provenientes del BO se encuentran segregadas o distribuidas ni tampoco si son azarosas o están genéticamente determinadas en las áreas olfativas correspondientes. Conocer estos aspectos es fundamental para entender la percepción olfativa; si la representación de odorantes en la CP es aleatoria, esto podría explicar el desarrollo de conductas aprendidas en asociación a estímulos odoríferos pero no explicaría el desarrollo de conductas innatas; por otro lado, es probable que éstas últimas estén determinadas genéticamente (Sosulski et al 2011).

Por tal motivo, el grupo de Richard Axel (Sosulski et al. 2011) desarrolló una técnica para trazar las proyecciones de neuronas principales del BO y así poder seguirlas a las áreas olfativas principales y determinar su distribución (Fig. 1). Esto se hizo al aplicar tetrametil-rodamina (TMR-dextran) por medio de una electroporación auxiliada de un microscopio de dos fotones. Esta técnica produce el marcaje de neuronas mitrales y empenachadas que inervan un solo

glomérulo y tiene la capacidad de resolver las terminaciones de las mismas en diversas áreas relacionadas al procesamiento olfativo. El marcaje de glomérulos en ratones que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control de la región promotora de receptores odoríferos permite determinar si existe algún patrón o estereotipo en la distribución de los axones de las células mitrales y/o empenachadas que inervan glomérulos cuya identidad es conocida.

Los resultados obtenidos demuestran que las proyecciones axonales de un solo glomérulo se distribuyen en la CP, Am, CE, TO y NOA. Todos los glomérulos examinados proyectan a las regiones mencionadas independientemente de la localización de los mismos dentro del BO. En la CP se observó un patrón de representación distributivo, mientras que en la Am, particularmente en el PLCo las proyecciones bulbares se distribuyen a manera de parches densos focalizados rodeados por zonas de menor densidad.

A pesar de la naturaleza difusa de las proyecciones, distintos glomérulos aparentan enviar fibras colaterales a regiones anatómicamente distintas y espacialmente invariables del PLCo. El patrón de proyecciones azarosas y espacialmente variables en la CP y la distribución constante de las mismas en el PLCo pueden servir de sustrato anatómico para las diversas conductas mediadas por el sentido del olfato en las que participan ambas estructuras (Sosulski et al. 2010).

Finalmente, dentro de esta sección se hará alusión a trabajos publicados recientemente que han abordado el procesamiento de la información olfativa desde el punto de vista de redes o circuitos neuronales. El año pasado, (Franks et al. 2011) introdujeron chanelorodopsina-2 (ChR2) en rebanadas de CP de ratón con el fin de caracterizar los circuitos intrínsecos (activados por pulso de luz) y evaluar su efecto sobre la actividad de las neuronas piramidales, cuya activación es dependiente de las aferencias sensoriales provenientes del BO.

Por los resultados obtenidos, proponen que un odorante cualesquiera puede generar entradas sinápticas supra-umbrales en un grupo pequeño de neuronas piramidales en la CP, este pequeño grupo de neuronas “activas” podrá entonces generar -mediante fibras colaterales recurrentes- excitación recurrente para reclutar un mayor número de neuronas piramidales que reciben

entradas sinápticas sub-umbrales. La potente retro-inhibición evocada por el circuito recurrente (interneuronas excitadas por axones recurrentes) evitaría la generación de nuevos potenciales de acción; en casos extremos, neuronas que no reciben aferencias sensoriales pueden ser reclutadas a través de este circuito recurrente (Franks et al. 2011).

De manera semejante, Poo e Isaacson (2011) llevaron a cabo un estudio en el que evaluaron la contribución del componente asociativo de la CP en el procesamiento de los estímulos odoríferos. La inhibición selectiva de las fibras de asociación de la CP por un agonista de receptores tipo GABA_B (pre-sinápticos en los axones recurrentes) permite aislar la actividad de las aferencias sensoriales de las asociativas (intracorticales) y en consecuencia evaluar su efecto sobre la transmisión sináptica excitatoria generada en la CP de manera independiente.

Los resultados muestran que las representaciones de los odorantes son moldeadas por las aferencias intracorticales, a juzgar por las respuestas electrofisiológicas evocadas por un grupo de odorantes ($n = 8$), las neuronas piramidales se dividen en dos grupos: aquellas que se encuentran “sintonizadas” a la mayoría de los odorantes presentados (7/8) y aquellas “sintonizadas” solamente a uno (1/8); cuando se aplica *baclofen* (agonista de receptores tipo GABA_B), el grupo de neuronas sintonizadas a un rango amplio de odorantes (7/8) reduce su capacidad de detección a uno o dos, mientras que el grupo de neuronas sintonizadas a solamente un odorante permanece prácticamente igual (Poo e Isaacson, 2011).

Esto último sugiere una influencia diferencial de las aferencias sensoriales y asociativas en la transmisión sináptica excitatoria, de tal forma que las aferencias sensoriales ejercen una mayor influencia en las neuronas que responden con potenciales de acción a uno de ocho odorantes presentados y las fibras de asociación prácticamente determinan el rango amplio de selectividad para el grupo de neuronas que es capaz de responder a la mayoría de los odorantes presentados (Poo e Isaacson, 2011).

En un trabajo del mismo año y que utiliza un modelo semejante de inhibición intracortical, Suzuki y Bekkers (2011), después de llevar a cabo una caracterización electrofisiológica de las

neuronas SL y PS en la CP concluyen que las neuronas SL, ubicadas en la porción superficial de la segunda capa (IIa), reciben aferencias de mayor intensidad provenientes del BO, mientras que las neuronas PS reciben aferencias de mayor intensidad por parte de otras neuronas PS y SL (asociación/intracorticales) (Suzuki y Bekkers, 2011).

Lo anterior sugiere que estas dos poblaciones de neuronas principales proporcionan dos “capas o sustratos de procesamiento” sináptico, la primera encargada de procesar la información sensorial (SL) y la segunda de hacer lo propio con la información intracortical de asociación (PS). Dentro de este modelo, el procesamiento de la información odorífera sería de la siguiente manera; al recibir estimulación odorífera, la actividad evocada en el BO recluta -casi exclusivamente- neuronas SL, cuya transmisión sináptica excitatoria evocaría la actividad las neuronas PS y de otras SL (Suzuki y Bekkers, 2011).

Los resultados obtenidos en los trabajos arriba mencionados parecen poner de manifiesto que la actividad intracortical en la CP generada por las aferencias sensoriales puede modular en gran medida el procesamiento de información odorífera. Por otro lado en dos de los trabajos se sugieren 2 grupos funcionales de neuronas que están involucradas en etapas o aspectos distintos del procesamiento cortical.

3. Técnicas para el estudio de la conectividad neuronal

3.1 Generalidades

A grandes rasgos, el estudio del sistema nervioso se ha enfocado en el establecimiento de los tipos celulares que le pueblan y las conexiones entre los grupos celulares que conforman redes neuronales; sin embargo, las relaciones funcionales entre estos componentes están lejos de ser bien comprendidas en muchas de las estructuras cerebrales. Por lo anterior es de vital importancia establecer cómo están interconectadas las neuronas; y para ello ha sido necesario desarrollar técnicas que permitan visualizar poblaciones específicas de neuronas con el fin de analizar las relaciones anatómicas y funcionales presentes en diversas áreas del SNC.

Un objetivo central del presente estudio fue establecer los sitios específicos de terminación de aferencias sensoriales e intracorticales (p. ej. GABAérgicas) sobre las neuronas principales de la CP, lo cual fue investigado mediante dos procedimientos de marcaje técnicamente diferentes realizados en el mismo sujeto experimental. De manera más específica, se combinó la lesión del BO que tiene como producto la degeneración ortógrada de las fibras del TOL, seguido de sacrificio y marcaje de interneuronas mediante la visualización inmunohistoquímica de las terminaciones sinápticas inmunoreactivas a GABA (irGABA); mediante esta estrategia fue posible determinar los sitios de terminación de los botones sinápticos olfatorios y locales sobre la neurona piramidal de la CP.

3.2 Transporte axonal de moléculas

A principio de la década de los setenta Kristensson y Olsson (1971) demostraron que la enzima peroxidasa de rábano (HRP) podía ser transportada retrógradamente al tejido de médula espinal tras ser inyectada intra-muscularmente. Posteriormente LaVail y LaVail (1974) hicieron lo propio en el SNC al observar el transporte desde la retina hasta el núcleo istmo-óptico del pollo; la detección de la actividad enzimática de la HRP es obtenida indirectamente a través de la visualización de un producto de reacción oxidado por la enzima.

En un medio adecuado, la HRP que se encuentra unida al tejido de interés reacciona y se une con el sustrato peróxido de hidrógeno (H_2O_2), resultando de esta unión un complejo capaz de oxidar variadas moléculas cromógenas donadoras de hidrógenos. Los cromógenos adquieren un color denso en su estado oxidado y se precipitan, lo que permite su detección como marcadores de la actividad de la HRP.

La técnica histoquímica requiere la selección de un cromógeno adecuado: debe ser soluble en la solución de reacción, debe cruzar las membranas biológicas libremente y debe tener una alta afinidad para ser oxidado por el complejo HRP- H_2O_2 . Además el cromógeno oxidado debe adoptar un color que sea visible, debe formar polímeros insolubles y estables que se precipiten y permanezcan en los sitios de oxidación, y por último no debe causar retardo alguno en la reacción

enzimática de HRP para permitir la suficiente acumulación del producto de reacción.

En un estudio comparativo y cuantitativo, Mesulam y Rosene (1979) obtuvieron que el cromógeno Tetrametilbencidina (TMB) al ser utilizado en las condiciones óptimas de incubación, resulta ser el cromógeno que otorga mayor sensibilidad de detección a la técnica. Las razones por las que el método de detección por TMB resulta ser el más efectivo no son del todo conocidas, pero se sabe que este es un compuesto más soluble en lípidos que los demás (cromógenos), por lo que su accesibilidad a la HRP a través de las vesículas membranosas no estaría tan dificultada, además esta propiedad también permite al cromógeno producir un polímero con mayor tendencia a la precipitación, sobre todo en medios polares; por otro lado, el producto de reacción posee un color azul oscuro que puede facilitar su observación al microscopio óptico.

3.3 Técnicas de trazado neuronal

El surgimiento de la técnica histoquímica de HRP, ha sustituido en gran medida el estudio de las aferencias por degeneración retrógrada, sin embargo, casi a la par han surgido otras técnicas que utilizan trazadores de distinta naturaleza y con diferentes potenciales para el trazado de conexiones neuronales, como los aminoácidos marcados con radiactividad, macromoléculas con propiedades tipo lectina, neurotransmisores, nucleósidos y recientemente trazadores de origen viral (Mesulam, 1982).

Entre las moléculas con propiedades de lectina (toxina tetánica, toxina del cólera, factor de crecimiento nervioso), destaca la aglutinina de germen de trigo (WGA), pues se une de manera específica a componentes membranales (*N*-acetil-*D*-glucosamina, *N*-acetilneuramínico). De tal forma que, al unir covalentemente HRP con WGA, la incorporación de la HRP a las neuronas de interés será más específica por dos razones: 1) la probabilidad de la incorporación de HRP se incrementa por la afinidad que posee la WGA a componentes membranales y 2) en cada evento de captura es posible que se incorpore más de una molécula de HRP, esto debido a que, al momento de preparar el conjugado HRP-WGA se pueden producir complejos que contengan más de una molécula de HRP por cada una de WGA (Mesulam, 1982).

Destaca también, otro tipo de trazadores que otorgan un alto valor informativo y que son de origen viral. La especificidad neuronal y el conocimiento de las propiedades virales, en especial su ciclo de replicación le confieren a esta técnica de marcaje una enorme precisión, ya que los virus son incorporados y transportados retrógradamente y de manera transneuronal incluso en relevos sinápticos de tercer orden en función del periodo de sobrevivencia entre la inoculación y el sacrificio. Otra propiedad por la que el virus puede ser detectado en neuronas alejadas del sitio de inyección es que poseen una capacidad auto-amplificadora, es decir, tienen la capacidad de replicarse dentro de su contenedor (neurona) y así continuar haciéndolo de manera secuencial en la neurona sucesiva (Morcuende et al. 2002).

Actualmente se tienen a disposición dos clases de virus para el estudio de la conectividad neuronal, aquéllos derivados de los alfa-herpesvirus (virus del Herpes, virus de la pseudo-rabia) y los denominados rhabdovirus (virus de la rabia). Existen variadas diferencias entre las dos clases de virus mencionadas; pero destaca que los alfa-herpesvirus provocan degeneración neuronal y en ocasiones pueden producir falsos positivos, mientras que el virus de la rabia (rhabdovirus) es el único trazador que es transportado en dirección retrógrada, de manera transneuronal y sin afectar en lo más mínimo el metabolismo neuronal (Ugolini, 2009).

La capacidad secretoria que poseen las neuronas les permite incorporar elementos de su entorno extracelular y transportarlos a los sitios de liberación (transporte axonal de moléculas), permite identificar poblaciones específicas neuronales y sus conexiones sinápticas. En efecto, aminoácidos depositados en el entorno inmediato del soma son rápidamente incorporados al citoplasma y utilizados para síntesis, entre otras proteínas, de los neurotransmisores. La translocación y acumulación sucesiva de éstos en los botones pre-sinápticos durante el proceso de neurosecreción, permitirían el marcaje anterógrado. En efecto, la aplicación de inyecciones minutas de aminoácidos marcados con isótopos y su acumulación posterior en los sitios de conexión presuntiva, y la detección de éstos mediante autorradiografía, permiten inferir un vínculo mono-sináptico. Esta técnica, perfeccionada en la década de los 70, permitió confirmar o, frecuentemente, corregir la conectividad de un enorme número de áreas y núcleos en el SNC

3.4 Degeneración de botones sinápticos.

Se sabe que la lesión accidental o experimental de un grupo de neuronas, es seguida de un proceso dinámico y predecible de degeneración que progresa centrífugamente, desde el soma hasta la(s) sinapsis (Brodal, 1980). Dicho proceso se conoce como degeneración ortógrada (DO) o anterógrada y en periodos cortos de sobrevivencia al daño, usualmente de dos a tres días, permite inferir el primer relevo sináptico y, por ende, la localización de la primera y segunda neurona del circuito estudiado.

Para poder estudiar los relevos sinápticos de las neuronas involucradas en el proceso de degeneración, es preciso observar las preparaciones al microscopio electrónico, ya que es la mejor forma de observar directamente las especializaciones sinápticas, tal y como lo documenta el estudio realizado por Gray y Hamlyn (1962), quienes determinaron los cambios sufridos por axones, terminales sinápticas y glía del *tectum* de pollo posteriores a la sección del nervio óptico.

En efecto, el daño letal de las neuronas es seguido por un proceso de degeneración sináptica, en el que se destaca la desaparición de sus vesículas dentro de los primeros 8 días, la desorganización de las mitocondrias, una acumulación conspicua de neurofilamentos dentro del citoplasma pre-sináptico y en periodos más prolongados de sobrevida la porción pre-sináptica es internalizada por los astrocitos, o bien desaparece, quedando en su lugar procesos gliales. En conjunto estas características le otorgan a la terminal degenerada una apariencia electrón-densa al observarla al microscopio electrónico (Gray y Hamlyn, 1962).

En breve, las alteraciones estructurales subsecuentes al daño del soma, o bien, del axón, y su identificación permite establecer su conectividad terminal, sin embargo, se deben tomar en cuenta las siguientes consideraciones cuando se llevan a cabo estudios de conectividad sináptica basada en los cambios degenerativos (Ebbesson, 1970):

- Se deben poder diferenciar los axones que están sufriendo degeneración de los que no.
- Se debe poder determinar si todos los axones o solamente una porción de los que han

sufrido degeneración están teñidos o son observables.

- Es preciso diferenciar entre los botones sinápticos y otras estructuras.
- Para poder afirmar con seguridad que un botón en proceso de degeneración estaba haciendo contacto sináptico con otra neurona se deben poder observar las estructuras post-sinápticas.

En ocasiones se han intentado demostrar los cambios degenerativos en base a tinciones de neurofilamentos, pues se ha observado en diversas preparaciones que éstos sufren cambios evidentes en terminales sinápticas, sin embargo, también se debe tomar en cuenta dos aspectos importantes:

- Cuando los procesos degenerativos son demostrados exitosamente con técnicas de tinción para neurofilamentos, esto se debe a que algunos componentes de la neurona (neurofilamentos) presentan cambios conspicuos en las terminaciones sinápticas y en otros sitios axónicos no sinápticos, pero existen otros casos en los que no se observa esta modificación en ningún lugar del axón. Esto demuestra que los procesos degenerativos no son homogéneos a través del sistema nervioso.
- Los métodos basados en tinciones de neurofilamentos distinguen estructuras sinápticas degeneradas en raras ocasiones.

4. Integración sináptica

4.1 Generalidades

En su artículo de 1967, Wilfrid Rall proponía que “...en particular, un modelo teórico que permita manipular el tiempo y el transcurso de las entradas sinápticas, además de la localización somatodendrítica de las mismas, haría posible el estudio del efecto que tienen estas dos características de entrada sináptica sobre la forma del potencial sináptico producido...”. Sugirió algunos puntos a considerar para modelar las propiedades eléctricas pasivas de las dendritas, y para ello utilizó tres parámetros de la teoría del cable; resistencia axial (r_i), que es la resistencia al flujo de corriente iónica a través de un axón o dendrita (disminuye si aumenta el radio del proceso neuronal y

aumenta en proporción con la distancia), capacitancia de membrana (C_m), que se refiere a la capacidad que tiene la membrana de separar y almacenar carga (aumenta en función del área membranal) y conductancia de membrana (G_m) que representa la suma de todas las conductancias iónicas de la membrana (es el recíproco de la resistencia).

El flujo de corriente sináptica a través de la conductancia de membrana (G_m) y capacitancia de la misma (C_m) produce un cambio en el potencial de membrana que depende de la geometría de la neurona y de las tres propiedades de cable que se han manifestado. La resistencia axial provoca una fuga en el voltaje entre el sitio de sinapsis y el soma (la zona de integración de los estímulos), por lo tanto, el “filtrado” que sufren las entradas sinápticas distales (p. ej. en dendritas distales) provocaría un PEPS de menor amplitud en el soma y a la vez un tiempo mayor en la integración temporal del mismo. Los análisis teóricos de Rall sugerían que las sinapsis serían identificadas funcionalmente en base a su localización dendrítica y que el impacto de sinapsis individuales disminuiría conforme más alejadas estuvieran del soma (Rall, 1967).

4.2 Sumación espacial y temporal de entradas sinápticas

El efecto del lugar de entrada sináptica sobre la generación de potenciales de acción ha sido estudiado principalmente en el hipocampo, neocorteza y motoneuronas de la médula espinal, la evidencia acumulada hasta ahora indica que las características de la integración sináptica son prácticamente independientes de la localización del estímulo (sinapsis).

En uno de los primeros estudios, Andersen et al. (1980) concluyeron que las sinapsis distales y proximales establecidas por las colaterales de Schaffer pueden provocar patrones de disparo muy similares en las neuronas piramidales de CA1. El grupo de Magee ha hecho registros duales de patch-clamp en los que han podido determinar que la amplitud del potencial excitatorio post-sináptico (PEPS) registrado en el sitio dendrítico de estimulación sufre un aumento de tres o cuatro veces -al ser registrado en el soma- en función de la distancia de la sinapsis al sitio de integración (Magee, 2000).

Estos datos indican que la amplitud local de un PEPS aumenta lo suficiente como para contrarrestar lo efectos de “filtrado”, por lo que cualquier entrada sináptica distribuida en un sitio cualesquiera de la dendrita presentará un PEPS de amplitud similar en el soma. Debido a que casi cualquier PEPS dura aproximadamente lo mismo en las neuronas de CA1, la sumación temporal de los mismos en el soma es virtualmente independiente de la localización de la sinapsis.

En contraste con la amplitud de PEPS's unitarios y la sumación temporal, se ha observado una ligera dependencia en cuanto a la localización de la sinapsis para llevar a cabo la sumación espacial en las neuronas piramidales de CA1. Al utilizar glutamato liberado iontoforéticamente, Cash y Yuste (1999) han demostrado que cuando se aplican dos estímulos en regiones distintas del árbol dendrítico apical, la sumación espacial de dichos estímulos es menor a la sumación lineal esperada por los dos eventos independientes; dicha “sub-linearidad” fue observada solamente para estímulos distales y desaparece tras aplicar estimulación repetida.

El impacto de los canales dendríticos en la forma y la sumación de los PEPS's unitarios de neuronas piramidales se ha estudiado en cierto grado y se conoce que en intervalos de tiempo cortos (0-5 ms) la sumación de dos estímulos temporalmente cercanos entre sí parece ser lineal o incluso supralinear, mientras que en intervalos de tiempo más grandes (95-100ms) la sumación parece ser sublineal.

La aplicación de ciertos fármacos modifica estos comportamientos; al aplicar antagonistas de los canales dependientes de voltaje de Na⁺, Ca⁺⁺, y NMDA la sumación supralinear disminuye o desaparece, mientras que si se aplican inhibidores de los canales de K⁺ y K⁺ activados por despolarización la sumación sublineal disminuye, también se ha determinado que la capacidad de cualquier sinapsis de ser sumada de manera supralinear es facilitada por la estimulación repetida, por tal motivo los últimos PEPS's de un tren de estimulación serán de mayor amplitud y tendrán más posibilidades de generar espigas dendríticas. En neuronas piramidales de CA1 esto se debe a que durante el tren de estimulación los canales dependientes de voltaje de K⁺ tipo A se encuentran desactivados (Magee, 2000).

En prácticamente todas las dendritas de mamíferos estudiadas hasta ahora se han encontrado canales iónicos dependientes de voltaje (propiedades activas), aunque la distribución de éstos en regiones sub-celulares es particular a cada neurona, las corrientes conducidas por estos canales son importantes para las propiedades integrativas. También se ha demostrado que los canales iónicos dependientes de voltaje ubicados en las dendritas permiten que potenciales de acción generados en el axón puedan viajar de manera retrógrada, en donde pueden sumarse con nuevas entradas sinápticas. Esta “electrogénesis” dendrítica puede afectar en gran medida la integración de potenciales sinápticos distales, como los que son recibidos en las dendritas distales de neuronas piramidales neocorticales de la capa V (Magee, 2000) y como ocurre de manera similar en la CP.

Para examinar si la amplitud de los PEPS's somáticos depende del lugar de la entrada pre-sináptica, Williams y Stuart (2002) llevaron a cabo registros de PEPS's unitarios entre neuronas piramidales de capa II/III y V; los análisis de los resultados indican que la amplitud de los PEPS's unitarios en el soma declina de manera exponencial conforme la entrada sináptica se aleja del sitio integrador (soma). De manera inesperada se observó que las propiedades dinámicas de los PEPS's unitarios presentan una dependencia sobre el lugar de entrada sináptica, ya que en dendritas distales se presentó el fenómeno de depresión por pulsos pareados, mientras que los PEPS's unitarios en dendritas proximales no presentaron esta característica.

La disminución dendro-somática (40x) del voltaje en PEPS's distales -que no puede ser compensada por el aumento de ~4 veces en la amplitud de sinápticos distales- sugiere que este tipo de estímulos (distales) no representan un efecto mayor sobre la tasa de disparo de la neurona. Sin embargo, la observación de que en las regiones apicales de las dendritas se generan ráfagas dependientes de Na^+ y Ca^{++} motivó a los autores a postular que los PEPS's distales solo pueden afectar la tasa de disparo de la neurona a través de la generación de espigas dendríticas. Para probar esta hipótesis se generaron PEPS's artificiales en zonas proximales y distales sin aplicar bloqueadores para el canal I_h (corriente catiónica activada por hiperpolarización) (Williams y Stuart, 2002).

Las espigas dendríticas fueron evocadas solamente cuando 2 PEPS's artificiales coincidieron temporalmente o cuando la separación -temporal- entre los dos estímulos fue menor o igual a 5 ms; las espigas se propagaron al soma para generar potenciales de acción y en promedio siempre generaron un mayor número de potenciales de acción que los que son producidos al estimular en las mismas condiciones el soma (Williams y Stuart, 2002).

Finalmente, Tamás et al. (2002) registraron simultáneamente tres neuronas neocorticales *in vitro*, con el objetivo de investigar el efecto que tienen dos entradas sinápticas (hechas por neuronas diferentes) convergentes sobre la sumación de las mismas por la neurona post-sináptica en común. Los resultados mostraron que cuando las entradas sinápticas coincidentes (ya sean excitatorias o inhibitorias) se encuentran disgregadas en los dominios somato-dendríticos ocurre una sumación lineal de los mismos, tanto en neuronas piramidales como en neuronas GABAérgicas, por otro lado, si las entradas sinápticas son cercanas entre sí, ocurre una sumación sublineal.

Estos resultados llevaron a los investigadores a proponer que cuando hay pocas entradas sinápticas activas, las operaciones llevadas a cabo por la neurona post-sináptica presentan una integración lineal, preservando así la información otorgada por cada sinapsis, mientras que cuando existen muchas sinapsis activas y cercanas entre sí, las neuronas integran la información de manera sublineal, confiriendo un “menor peso” a estas últimas (Tamás et al. 2002).

En un estudio subsecuente, Tamás y Szabadics (2004) registraron las respuestas electrofisiológicas de neuronas piramidales a entradas sinápticas unitarias establecidas en el segmento inicial del axón (SI) y determinaron la posición y el número de contactos hechos por cada neurona pre-sináptica (axo-axónica); de acuerdo a lo establecido por ese mismo grupo recientemente (ver arriba), se observó que la sumación de potenciales inhibitorios post-sinápticos (PIPS) ocurre de manera sublineal.

4.3 Integración sináptica en la CP

En el 2009, el grupo de Bathellier llevó a cabo registros simultáneos en la modalidad de “*patch-clamp*” en soma y dendritas junto con estimulación extracelular mínima de las fibras del TOL para investigar las propiedades integrativas de la CPa sobre las entradas sensoriales. De manera particular, los registros fueron hechos en las tres clases de neuronas principales identificadas en la CP. Los datos obtenidos muestran que las dendritas apicales de neuronas piramidales y semilunares presentan propagación retrógrada de los potenciales de acción, entrada de Ca^{++} y espigas dendríticas locales. A diferencia de otras neuronas piramidales de mamífero, las espigas dendríticas generadas en la capa Ia tienen un efecto despreciable sobre el disparo de las neuronas, sin embargo, las espigas dendríticas en regiones más proximales (capa Ib) sí contribuyen a la generación de potenciales de acción (Fig. 18).

Se ha visto que la presencia de espigas locales (Calcio, Sodio o dependientes de NMDA) controla los procesos integrativos en otras neuronas corticales, lo que sugiere que existe una segregación funcional de la integración sináptica en los árboles dendríticos de la mayoría de las neuronas corticales; por ello se resalta la importancia de los conjuntos de sinapsis establecidos en determinadas regiones espaciales de la neurona (convergencia de entradas sinápticas funcional y espacialmente similares). En el caso de las neuronas de la CP parece no haber eventos regenerativos (en compartimientos subcelulares activos) que contribuyan con la generación de potenciales de acción y parece ser que estas neuronas no reciben contactos sinápticos coincidentes, tanto espacial como temporalmente (Bathellier et al. 2009).

Los estudios computacionales han sugerido a las neuronas que presentan espigas dendríticas como un sistema análogo a una bicapa de procesamiento informativo. Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que una red neuronal cuyas células presentan un único umbral de respuesta o activación puede ser suficiente para llevar a cabo las operaciones informáticas necesarias para la discriminación de odorantes. En la discusión, los autores comentan que por la relación que existe entre el arreglo “compacto” de las dendritas apicales y la pérdida de corriente a lo largo de las mismas, el efecto de las entradas sinápticas tiende a ser

prácticamente independiente de los lugares donde se establezcan las mismas y que la generación de potenciales de acción es más eficiente cuando las neuronas reciben entradas sinápticas distribuidas a lo largo del árbol dendrítico distal (Bathellier et al. 2009).

De tal forma que proponen lo siguiente; entre el 10 y 20% del total de espinas dendríticas apicales (de neuronas piramidales y semilunares) deben ser activadas para alcanzar el umbral de disparo de una neurona cuyo potencial de membrana tiene un valor de -75 mv, esto quiere decir que se necesitarían ~30-40 fibras provenientes del LOT para “activar” a una neurona piramidal. La excepción la constituyen las neuronas semilunares, que solo requerirían estimulación por parte ~10 aferentes sensoriales para generar potenciales de acción (Bathellier et al. 2009), esta sugerencia es consistente con los datos obtenidos por Suzuki y Bekkers en el 2011.

III. Justificación

Es claro que el SNC en general y la corteza cerebral en particular, decodifican estímulos ambientales y de otros centros nerviosos interrelacionados estructural y funcionalmente para la emisión de respuestas de adaptación que condicionan la viabilidad del sujeto. El sistema olfativo representa uno de los órganos de relación directamente involucrados con la identificación de alimentos, reconocimiento de congéneres y depredadores, procesos sustantivos en la conservación y reproducción de las especies, por lo que el estudio de la vía olfatoria es vital para la obtención de datos que proporcionen información acerca del procesamiento y la integración de estímulos sensoriales.

Este proyecto de investigación básica se enfocó en la continuación de una sucesión de estudios relacionados con la estructura celular del sistema nervioso de los mamíferos (Larriva-Sahd, 2008; Paredes y Larriva-Sahd, 2010) y expandirlos al estudio de su conectividad. Para llevar a cabo este estudio, se desarrolló un procedimiento que combina dos maniobras experimentales para obtener la caracterización topográfica de las aferencias bulbares e intrínsecas (interneuronas) sobre las células piramidales de la CP.

El estudio secuencial de poblaciones novedosas en el SNC mediante el diseño, implementación y uso de técnicas actuales de inmunohistoquímica e inmuno-electrón-microscopía reviste especial interés e impacto en el campo general de la neurobiología. Es en base a este tipo de estudios que se determinará la circuitería del sistema nervioso. En la CP, al igual que en la neocorteza, las neuronas piramidales constituyen la célula de respuesta o eferente. A diferencia de ésta y del hipocampo (arquicorteza), en que se conoce la distribución topográfica de aferencias sobre sus neuronas piramidales, el sitio de terminación de las fibras olfatorias e interneuronas sobre la neurona piramidal es en buena medida desconocido.

Relevante para el estudio a realizar son las observaciones de Johnson et al. (2000), ya que demuestran que las células piramidales de la CP emiten fibras colaterales prácticamente a todo el hemisferio al que corresponden, incluyendo áreas corticales y sub-corticales relacionadas con el procesamiento olfativo. Esto sugiere que la CP establece nexos funcionales recíprocos con áreas corticales de integración sensorial y con áreas sub-corticales que le imprimen al estímulo características emocionales, de memoria y de toma de decisiones (Schoenbaum y Eichenbaum, 1995). El conocimiento de las influencias sinápticas que recibe la célula piramidal y la topografía de éstas, son una aproximación preliminar, pero necesaria para el eventual establecimiento de la fisiología de la corteza olfatoria primaria.

IV. Hipótesis

La distribución de las aferencias olfatorias e intrínsecas en las diferentes partes de la neurona piramidal de la corteza olfatoria primaria está en función de su sitio de origen.

V. Objetivos

Para el desarrollo de este proyecto, se propuso como objetivo general la utilización de una técnica que combina degeneración anterógrada e inmunohistoquímica para establecer el patrón de distribución de las aferencias sensoriales e intrínsecas sobre la neurona piramidal de la CP. De manera específica, combinamos de manera sucesiva, en un mismo sujeto, dos maniobras experimentales de marcaje, como sigue:

- Degeneración anterógrada en los axones de las neuronas principales (mitrales y empenachadas) del BO mediante lesiones electrolíticas de la corteza bulbar.
- Inmunohistoquímica dirigida al neurotransmisor GABA en tejidos de CP provenientes de ratas con lesión electrolítica.

Los objetivos particulares arriba mencionados permitieron obtener información acerca de la distribución topográfica de las aferencias olfativas/sensoriales (BO) e intrínsecas (CP, inmunoreactivas a GABA) en las neuronas piramidales de la capa II de la corteza piriforme.

VI. Material y Métodos

1. Sujetos experimentales

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a los lineamientos bioéticos del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México para el uso de animales experimentales, de acuerdo con las normas estipuladas en la “Guide for care and use of laboratory animals” del NIH (1996).

Los experimentos se realizaron en 31 ratas albinas (cepa *Wistar*) cuya edad fue de 10 semanas, sexo masculino y un peso de entre 390 y 400 gramos. De las 31 ratas usadas, 16 fueron utilizadas con la poca fortuna de no haber podido observar sus tejidos de CP en el ME, esto ocurrió por varias razones; el proceso de aprendizaje para llevar a cabo la lesión en el estereotáxico, el proceso de aprendizaje de perfusión, la estandarización de la inmunohistoquímica pre-inclusión (cuya técnica recién fue introducida al laboratorio) e incluso algunos animales que murieron durante la cirugía.

Otras 5 ratas fueron sacrificadas y perfundidas con el único propósito de observar la estructura de la CP en tejidos intactos (control), este grupo fue ampliado con 2 sujetos más pero en condiciones ligeramente distintas, es decir, se hizo cirugía estereotáxica con el objetivo inicial de lesionar el BO, sin embargo, la lesión no fue bien dirigida y aún así el animal fue sacrificado y su tejido de CP procesado para observación en el ME (sin inmunohistoquímica). Las 8 ratas restantes de las

31 utilizadas fueron sometidas a las dos maniobras experimentales (lesión del BO e inmunohistoquímica), seguidas de sacrificio por perfusión intravascular.

De cada una de las ratas cuyos tejidos fueron observados en el ME, se obtuvieron entre 10 y 15 bloques de *epon* con contenido cortical y de cada bloque se obtuvieron de 2 a 3 rejillas de cortes finos, en cada una de las rejillas se obtienen ~15 cortes. En las ocasiones en las que se llevaron a cabo observaciones en cortes seriados, éstos fueron obtenidos en rejillas especiales con forma de dona, cuyo orificio está hueco, a estas rejillas se les aplicó un polímero (*formvar*) que sirvió de sostén a los cortes seriados; la utilización de estas rejillas evita que los “barrotes” de las rejillas comunes impidan el seguimiento de estructuras a través de varios cortes. Las series de cortes podían ser de 20 hasta 80 cortes. Las reconstrucciones tridimensionales fueron hechas con la ayuda del software de acceso libre RECONSTRUCT.

Finalmente, dentro de los 5 animales intactos usados para estudiar el neuropilo de la CP en condiciones no experimentales, se obtuvieron cortes finos de 3 de ellos para llevar a cabo conteo de sinapsis en la capa II de la CP. Para cada animal se capturaron ~50 micrográficas que contenían -c/u- alrededor de 784 μm de tejido y se obtuvo el porcentaje relativo de los tipos de sinapsis observadas (axo-espinosa, axo-dendrítica y axo-somática) Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico Jeol 1010.

2. Doble Marcaje

Tras provocar una lesión electrolítica en el BO, se obtuvieron rebanadas parasagitales del encéfalo que contenían a la CP, y éstas fueron sometidas a un tratamiento inmunohistoquímico seguido de procesamiento, corte y observación mediante microscopía electrónica de transmisión (Larriva-Sahd et al. 1985; Larriva-Sahd, 2008).

2.2 Degeneración Ortógrada.

Con el objeto de provocar degeneración ortógrada del TOL se hicieron lesiones electrolíticas (30mA durante 30 segundos) en el BO principal de ratas *Wistar* macho de 10 semanas de edad (390-400 g.) mediante cirugía esterotáxica (8.3 mm de bregma; 0.9mm, y 1.5mm;

anteroposterior, lateral y vertical, respectivamente) (Paxinos y Watson, 1982). El sacrificio se llevó a cabo a las 72 horas mediante perfusión intravascular con aldehídos (PFA 4%, Glutaraldehído 2.5% en buffer de fosfatos 0.15 M), seguido de un periodo de ~2 hrs. de post-fijación. Posteriormente, los encéfalos fueron crio-protectados con inmersión en sacarosa en concentraciones de 10%, 20% y 30%.

Para confirmar el sitio de lesión se obtuvieron los BO's de animales lesionados, se incluyeron en *Tissue-tek* (polímero) y se cortaron en un criostato; los bulbos fueron orientados para obtener cortes coronales de 40 μm de grosor. Después de llevar a cabo un proceso de deshidratación con alcoholes en concentraciones ascendentes, los tejidos son teñidos con violeta de cresilo y observados al microscopio para determinar el sitio y la extensión de la lesión electrolítica en BO (ver resultados).

2.3 Inmunohistoquímica

Se llevó a cabo por el método de pre-inclusión. Pre-inclusión (Larriva-Sahd et al. 1986); Los encéfalos sin BO's y cuya lesión en la capa mitral fue confirmada (Fig. 3) fueron sumergidos en Nitrógeno líquido durante 15 segundos, posteriormente se obtuvieron cortes de 50 μm en orientación sagital y éstos fueron sometidos a un proceso de inmunohistoquímica por flotación de la siguiente manera:

- Lavar durante 1 a 2 horas o durante toda la noche en PBS.
- Tratar los tejidos con borohidruro de Sodio al 1% en PBS 0.1 M, a temperatura ambiente durante 30 minutos y en rotación.
- Lavar los tejidos 2 veces (media hora cada vez) en PBS 0.1M, en rotación.
- Incubar en BSA al 1% en PBS durante 2 horas en rotación.
- Incubar el anticuerpo primario durante toda la noche a temperatura ambiente y en rotación. GAD 65 (1:1000), GABA (1:2000).
- Lavar 3 veces con PBS (5 minutos cada vez) en rotación.
- Incubar durante dos horas con el anticuerpo biotinilado IgG en cabra anti-conejo (1:2000

y 1:3000) y mantener en rotación.

- Preparar el kit ABC media hora antes de usarlo.
- Lavar 3 veces con PBS (10 minutos cada vez) en rotación.
- Incubar con el kit ABC durante dos horas en rotación (5ml PBS + 1 gota de A + 1 gota de B).
- Lavar 3 veces con tris 0.05 M pH 7.5 (10 minutos cada vez) en rotación.
- Incubar en DAB por 7 minutos a temperatura ambiente (2.5 ml de agua destilada + 1 gota de buffer + 2 gotas de DAB + 1 gota de agua oxigenada) en rotación.
- Lavar 3 veces con PBS (10 minutos cada vez) en rotación.
- Obtener los bloques para la microscopía electrónica.

2.4 Inclusión en resinas epóxicas

Una vez obtenidos los bloques de tejido para la inclusión en resinas epóxicas, éstos son fotografiados bajo el microscopio óptico con el fin de observar la distribución de la inmunoreactividad en cada bloque (ver resultados). El proceso de inclusión es el siguiente; los bloques de tejido son post-fijados en glutaraldehído al 3% en PBS 0.1 M por quince minutos, en tetraóxido de Osmio al 1% durante media hora (PBS 0.1 M) y son contrastados con acetato de Uranilo acuoso al 2% durante 15 minutos.

La deshidratación de los mismos es con acetona en concentraciones ascendentes (60%, 70%, 80%, 90% y 3x100%) de 10 minutos cada una, los tejidos son incubados toda la noche en *epon* final y acetona (1:1) y la mañana siguiente se añade otra parte de acetona (2:1). Finalmente, los bloques de tejido son colocados en un molde al que se le añadirá el *epon* final en estado líquido, la polimerización se lleva a cabo en una estufa a 60 °C por 24 hrs.

2.5 Microscopía electrónica

Los cortes para ME fueron obtenidos en un ultramicrotomo; al estar polimerizado el bloque que contiene el tejido éste es rebajado a mano con una navaja para moldear la superficie de corte a manera de trapecio (pirámide), después el bloque es montado y cortado con una cuchilla de

vidrio. Primero se obtuvieron cortes semi-finos con un grosor de ~500-600 nm, éstos fueron montados en un porta-objetos y teñidos con azul de toluidina para observar al microscopio de luz y definir la región del bloque que se observó con el microscopio electrónico (ver resultados). La pirámide moldeada en un principio fue rebajada nuevamente para reducir la superficie de corte de manera que ésta se limite solamente a la región que se quiere observar. Se obtuvieron cortes finos con un grosor aproximado de 70-90 nm, éstos fueron montados en una rejilla de níquel y contrastados con acetato de Uranilo (10 min.) y citrato de Plomo (10 min.)

2.6 Interpretación del doble marcaje.

La observación a nivel del microscopio electrónico (ME) de especímenes procesados con la doble técnica permitió identificar en una misma preparación las terminales degeneradas procedentes del BO y las de interneuronas GABAérgicas por su inmunoreactividad a los anticuerpos contra GAD y GABA. Los sitios de terminación de los axones cuyas neuronas se alojan en el área lesionada, se evidencian por cambios degenerativos consistentes en incremento en la densidad electrónica, retracción, vesiculación y/o degeneración neurofibrilar.

Adicionalmente, la visualización inmunohistoquímica de las sinapsis GABAérgicas (inmunopositivas a GAD 65/67 y GABA) permitió establecer la distribución de éstas en la neurona piramidal. Los sitios específicos de terminación de interneuronas y de las aferencias del BO (degeneración ortógrada) se determinaron seleccionado previamente al microscopio de luz las áreas que tuviesen neuronas piramidales (capa II de CP).

La identificación de las neuronas piramidales al microscopio electrónico es posible de inferir, ya que las neuronas que se encuentran en la capa II y que no presentan inmuno-reactividad al neurotransmisor GABA tienen grandes probabilidades de ser neuronas glutamatérgicas (piramidales o semilunares, ambas de proyección). Las observaciones hechas en cortes seriados fue una herramienta con la que se pudo conocer la identidad de las neuronas de proyección, pues permite determinar las características ultraestructurales a lo largo del eje z. Esto último permite obtener mayor información acerca de las neuronas observadas, como su tamaño aproximado, características citoplásmicas o incluso la formación de mielina sobre el SI de un axón; en

conjunto estos atributos permitieron diferenciar a las neuronas de proyección de las locales. Las observaciones al ME permitieron establecer la presencia de elementos marcados (ver arriba) y, en su caso, de las aferencias a lo largo del soma y dendritas de la célula piramidal.

VII. Resultados

1.1 Doble marcaje en la CP

Para poder obtener cortes finos con el doble marcaje y observarlos al ME, en primera instancia fue necesario confirmar que la lesión electrolítica fue dirigida a la zona deseada (p. ej. corteza bulbar), por tal motivo, los bulbos de los animales lesionados fueron separados y procesados de manera independiente al resto del encéfalo para llevar a cabo un proceso histológico (ya descrito en la sección de métodos) que permitiera observar el sitio afectado en el BO. La figura 4 está compuesta por una serie de fotografías representativas de las lesiones hechas en 8 ratas y también se presenta la histología de animales intactos por razones comparativas.

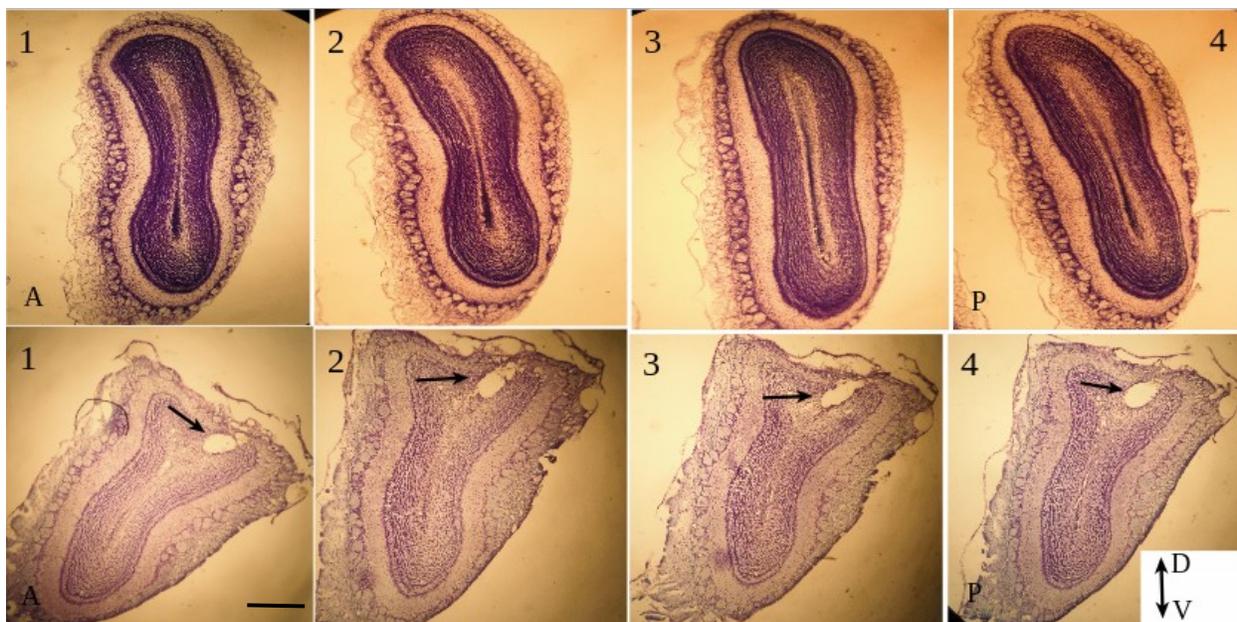


Figura 4. Tinción de Nissl (violeta de cresilo) en la que se muestran fotografías de cortes coronales de BO intacto (paneles superiores) y cortes de la lesión electrolítica (paneles inferiores) a lo largo del eje anteroposterior del BO (A-P), las flechas señalan la región tisular dañada por efecto de la lesión. Barra de medida: 1mm

Una vez que se determinó el sitio del daño tisular, los encéfalos de los animales cuya lesión fue

confirmada fueron procesados por inmunohistoquímica dirigida al neurotransmisor GABA o GAD 65/67. La *inmuno* fue hecha en flotación y de los encéfalos procesados (rebanadas de 40 μm) se obtuvieron y fotografiaron bloques que contenían CP inmunoreactiva al neurotransmisor GABA. Posterior a la inclusión en *epon*, se obtuvieron cortes semi-finos que pueden ser comparados con las fotos del mismo bloque tomadas en fresco; finalmente, del corte semi-fino se delimitó con una navaja una región de interés mediante la confección de una “pirámide” (trapecio) muy pequeña, los cortes finos son obtenidos de dicha región previamente observada en el microscopio de luz (Fig. 5).

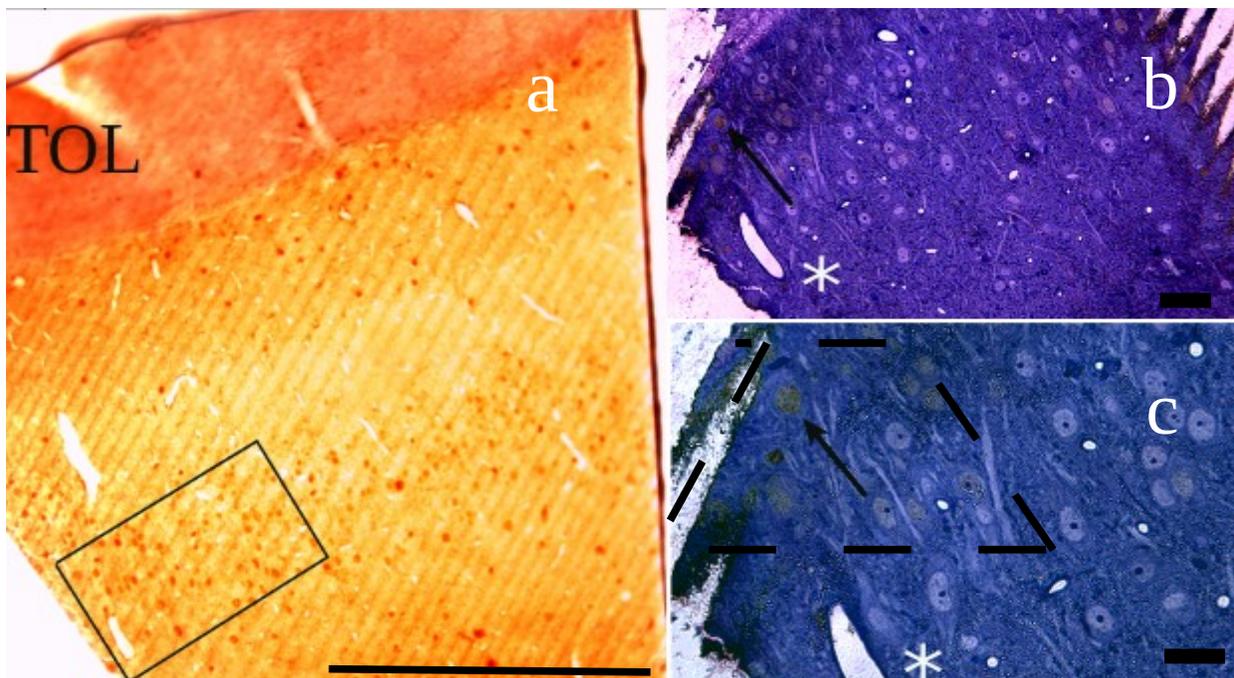


Figura 5. Proceso de obtención de cortes finos para ME. **a.** Fotografía de un bloque de CP ir a GABA previo a la inclusión. Escala de medida: 0.5 mm **b.** Corte semi-fino del mismo bloque que en a (región delimitada) teñido con toluidina en donde se observa la ir a GABA. Escala de medida: 50 μm **c.** Un mayor acercamiento que en b, permite observar con claridad los somas inmunoreactivos a GABA, además se representa la zona que será obtenida por el corte fino, el asterisco señala un capilar que sirve de referencia en los tres cortes; todos los cortes fueron obtenidos en orientación sagital. Escala de medida: 35 μm

Los cortes finos obtenidos fueron observados al ME, en donde se confirmó que la lesión del BO produce cambios degenerativos conspicuos (Fig. 6 a y b) en las terminales axónicas de las fibras que conforman el TOL, dichos cambios consisten en retracción, fragmentación membranal y en la asociación de los botones degenerados con procesos gliales (astrocitos).

Destaca de manera importante, que los axones de las neuronas de proyección del BO emiten colaterales a lo largo de la corteza olfativa primaria y los resultados obtenidos permiten confirmar la presencia de las aferencias provenientes del BO (botones degenerados) en regiones profundas de la CP, particularmente en la capa II de la misma.

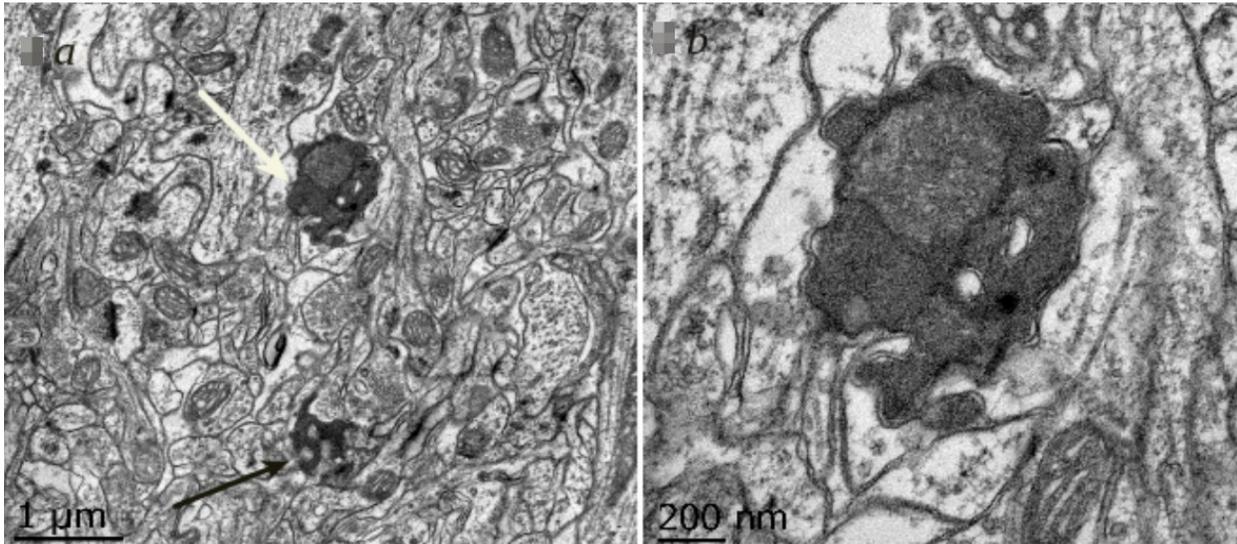


Figura 6. Micrografía que confirma que la lesión de la capa mitral del BO provoca la degeneración de terminales de neuronas mitrales en la CP. En **a** se observan 2 terminales en proceso de degeneración (flechas), el botón denotado con la flecha blanca se presenta a un aumento mayor en **b**.

Por otro lado, fue posible llevar a cabo la identificación de la inmunoreactividad a GABA en los somas y procesos neuronales a nivel ultra-estructural (Fig. 7). El marcaje que se observa en la micrografía es específico, pues se encuentra delimitado en regiones circunscritas (procesos neuronales). La exitosa identificación de las aferencias provenientes del BO y de las generadas en la propia CP (GABAérgicas) permitieron determinar la distribución de las mismas sobre las distintas regiones de las neuronas piramidales de la CP (soma, dendritas proximales, axón).

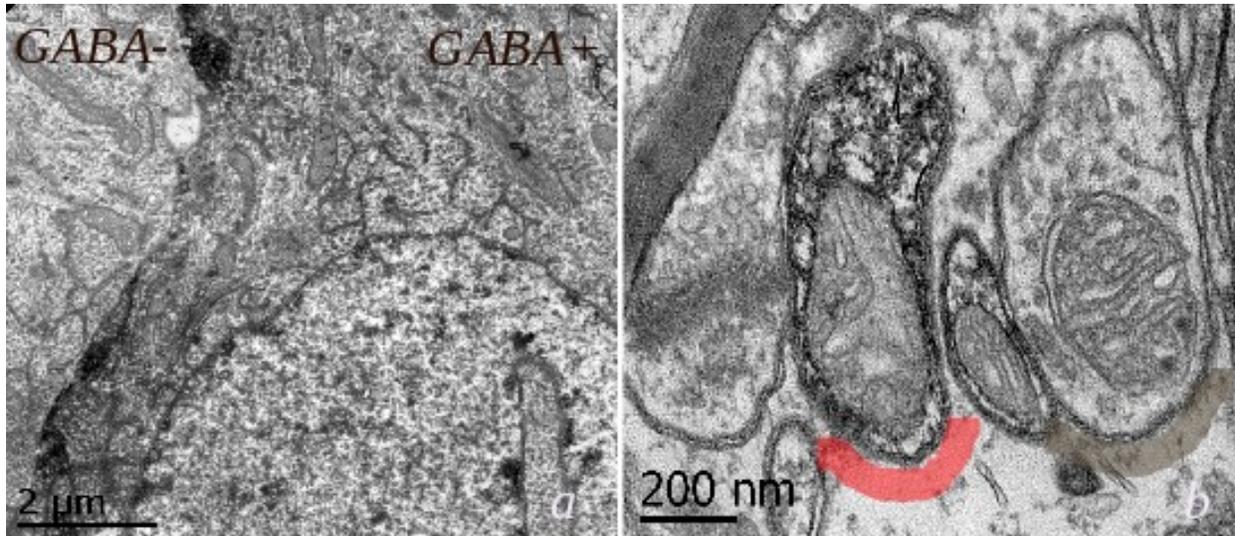


Figura 7. En el panel se muestran imágenes de un soma y dos procesos neuronales inmunoreactivos a GABA. En **a** se observan dos cuerpos neuronales adyacentes, el de la derecha presenta immuno-reactividad ante GABA y el de la izquierda no. En **b** se muestran dos procesos neuronales adyacentes, en este caso el de la izquierda (rojo) es immuno-reactivo a GABA y el de la derecha no (café).

1.2 Distribución de las aferencias olfatorias e intrínsecas en la CP

Como se ha mencionado, las células mitrales y/o empenachadas conducen la información -procesada localmente- de los estímulos sensoriales a las áreas corticales olfativas correspondientes por medio de la emisión de fibras colaterales derivadas del TOL.

La distribución de las mismas y de las interacciones sinápticas que llevan a cabo con las poblaciones neuronales de la CP son en gran medida desconocidas, aquí se reporta que las fibras colaterales emanadas del TOL no están restringidas a la porción superficial de la primera capa (Ia) y se encuentran asociadas a cuerpos neuronales ubicados en la capa II (Fig. 8).

Esta observación contrasta con el modelo de conectividad “canónico” establecido para la CP que fue propuesto en los años setenta (Price, 1973) y hasta la fecha no se ha debatido, pues en todos los trabajos recientes se afirma que las aferencias provenientes del BO solamente hacen contactos sinápticos con las dendritas distales de neuronas piramidales en la capa Ia (Bathellier et al. 2009; Poo e Isaacson 2009; Suzuki y Bekkers 2011).

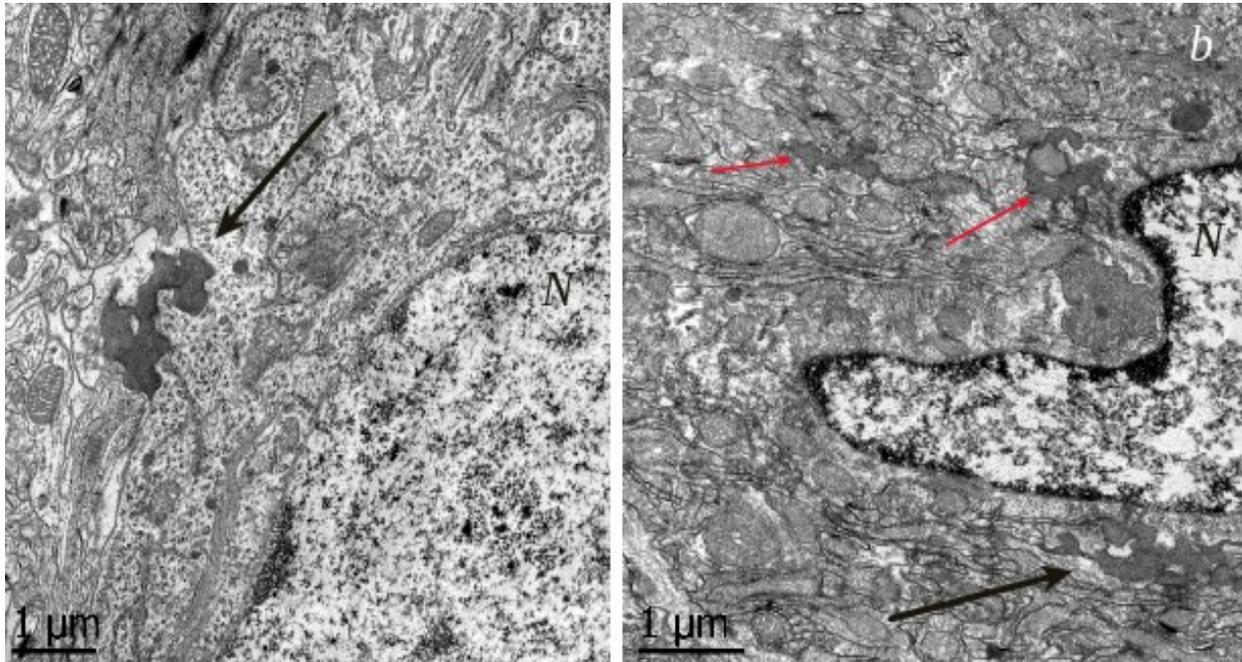


Figura 8. Micrografías de la CP que muestran botones en proceso de degeneración. En a) solamente se observa un botón en proceso de degeneración (flecha negra) que se encuentra asociado a un cuerpo neuronal, en b) se observa de igual forma un botón degenerado en posición adyacente a un cuerpo neuronal (flecha negra), además se observan otros botones degenerados cercanos al soma (flechas rojas). N= núcleo.

Estas observaciones permiten inferir que las terminales axónicas procedentes del BO establecen contactos sinápticos directamente con el soma de neuronas piramidales en la capa II de CP, cualidad que -potencialmente- le otorga a las células principales del BO una mayor probabilidad de generar potenciales de acción sobre las neuronas blanco, es decir, de reclutar a las neuronas eferentes del sistema al que proyectan.

Así mismo, se han observado botones en proceso de degeneración asociados a dendritas proximales de neuronas piramidales en la capa II (Fig. 9), en este caso, la presencia de una sustancia Nissl abundante y bien desarrollada en la región perinuclear de la célula permite sugerir que se trata de una neurona piramidal.

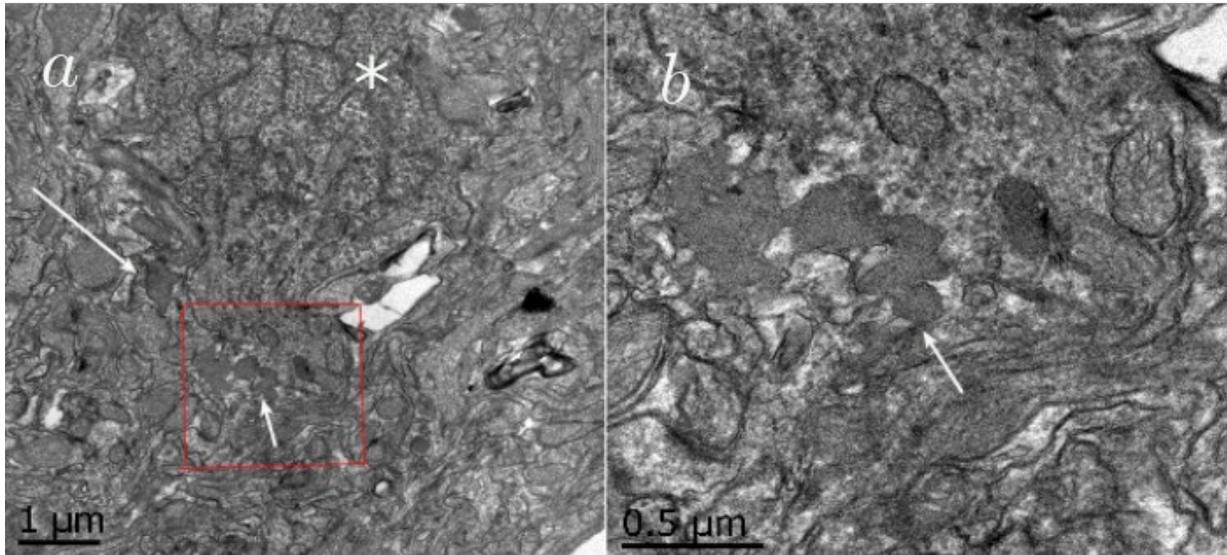


Figura 9. Las aferencias provenientes del BO establecen contactos sinápticos putativos con dendritas proximales en la capa II de la CP. **a.** Dos botones en proceso de degeneración se encuentran asociados a una dendrita proximal de una neurona piramidal en la capa II (flechas), nótese la sustancia Nissl bien desarrollada (*). **b.** Micrografía a mayor aumento del recuadro en a, nótese que entre el botón degenerado y la dendrita no hay procesos intervinientes.

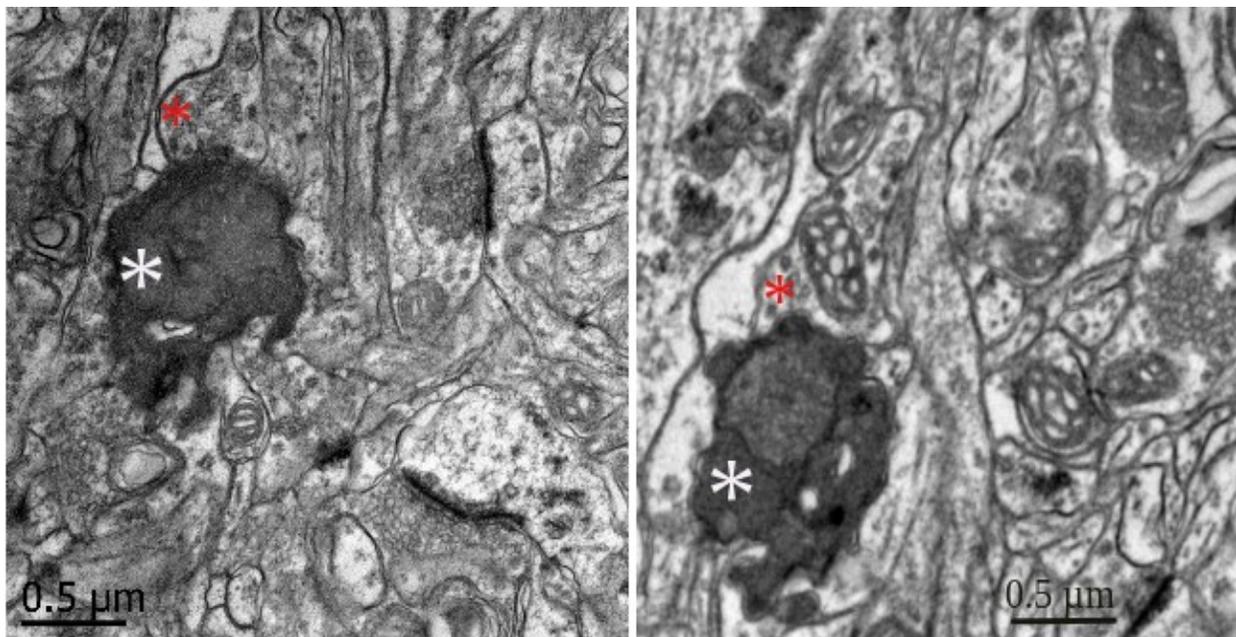


Figura 10. Botones sinápticos terminales con contenido vesicular asociados a los botones en proceso de degeneración. En los dos paneles se muestran botones sinápticos en proceso de degeneración (asterisco blanco) asociados a botones sinápticos con vesículas (asterisco rojo), lo que sugiere que puede haber un mecanismo de modulación pre-sináptica de las aferencias que provienen del BO.

La presencia de botones en proceso de degeneración asociados a cuerpos neuronales y dendritas proximales en la capa II de la CP, aunado con el bajo conteo de sinapsis axo-somáticas y sinapsis

establecidas en segmentos dendríticos proximales (ver abajo) sugiere que estas colaterales axónicas (procedentes del BO) pueden ejercer un impacto considerable sobre la generación de potenciales de acción en la población neuronal de la segunda capa cortical piriforme.

Finalmente, se ha observado de manera consistente que los botones que se encuentran en un proceso degenerativo (indicativo de que ese botón tiene su origen en el BO) están asociados a botones sinápticos íntegros en su estructura (Fig. 10), es decir, las características ultraestructurales de estos últimos son bien identificables y además proporcionan un control interno de la integridad estructural del tejido. Esta interacción anatómica podría servir de sustrato para un mecanismo de modulación pre-sináptica de las aferencias provenientes del BO.

Con respecto a las aferencias originadas en la propia CP, se determinó que la mayoría de los procesos inmunoreactivos a GABA establecen contactos sinápticos con las diáfisis dendríticas o ejes dendríticos (Fig. 11), sin embargo, también se observaron procesos inmunoreactivos a GABA asociados a espinas dendríticas .

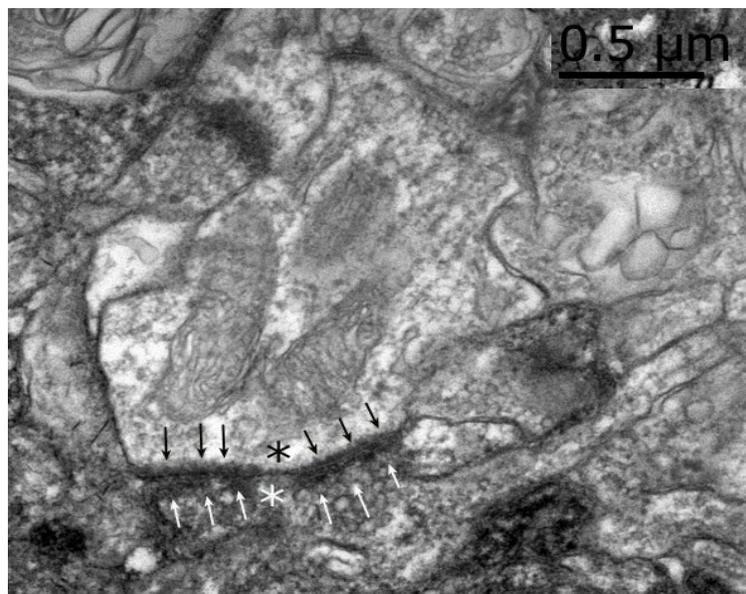


Figura 11. Aferencias inmunoreactivas a GABA dentro de la CP. Sinapsis axo-dendrítica entre una neurona ir a GABA y una dendrita no marcada.

Por otro lado, el análisis del tejido de la CP en ratas sin manipulación experimental permitió confirmar la presencia de contactos axo-axónicos en la capa II de la CP, en la figura 12 se

muestra de manera representativa una serie de 30 cortes finos obtenidos de manera seriada (10 en la figura), en donde se presenta el segmento inicial de un axón (SI).

El SI fue cortado de manera transversal y se pueden observar con claridad las características que le distinguen de otras regiones del propio axón, como el material sub-membranal electrón-denso y la agrupación de microtúbulos en fascículos (Westrum, 1970). Las interacciones sinápticas axo-axónicas son mediadas -en la porción pre-sináptica- por interneuronas inhibitorias (GABAérgicas) cuya morfología somato-dendrítica y axónica son distinguibles, de hecho, el nombre de dichas neuronas alude a la morfología de las colaterales axónicas, que mimetizan un “candelabro” que envuelve los SI's de neuronas, de tal forma que la actividad de dichas interneuronas axo-axónicas tiene la potencialidad de controlar el “disparo” de las neuronas con las que establece contactos sinápticos.

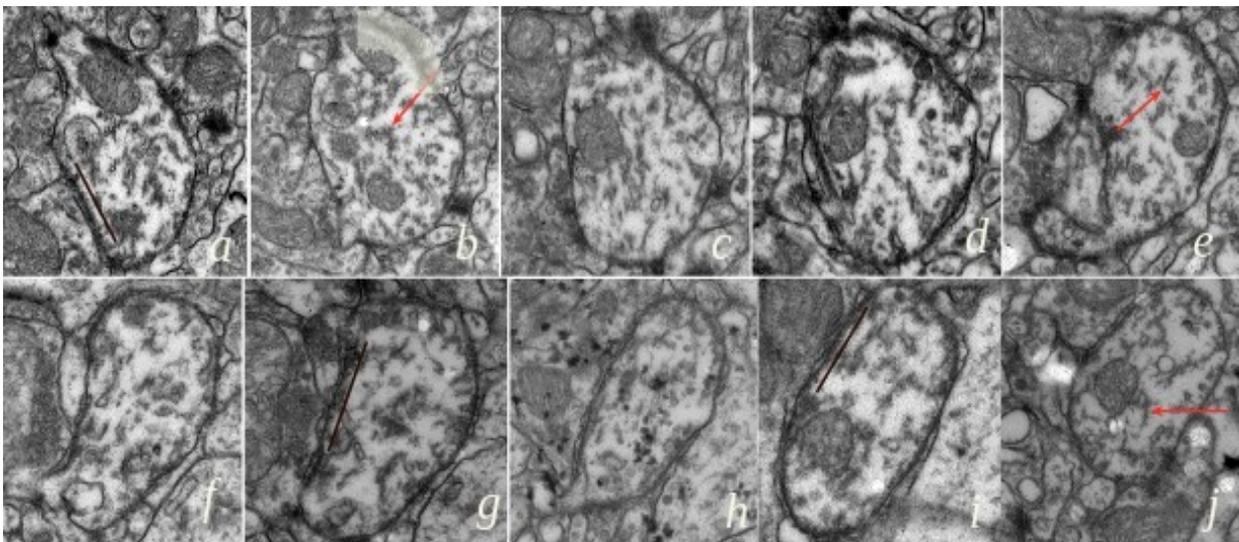


Figura 12. En el panel se muestran diez imágenes (a-j) que representan una serie de 30 cortes transversales a través del SI de un axón en la CP. Se observan las dos características que distinguen al SI de un axón. Las flechas rojas señalan los fascículos de microtúbulos y sobre las líneas negras se aprecia la densidad sub-membranal. La región sombreada en b denota una sinapsis axo-axónica.

En este trabajo se presenta la correlación ultraestructural de las relaciones morfológicas reportadas por Larriva-Sahd (2010) y de los análisis inmunohistoquímicos hechos por Wang y Sun (2012), quienes reportan la presencia de dicha población neuronal en la CP; la figura 13 muestra la reconstrucción tridimensional del mismo SI recibiendo una aferente para formar una sinapsis axo-axónica.

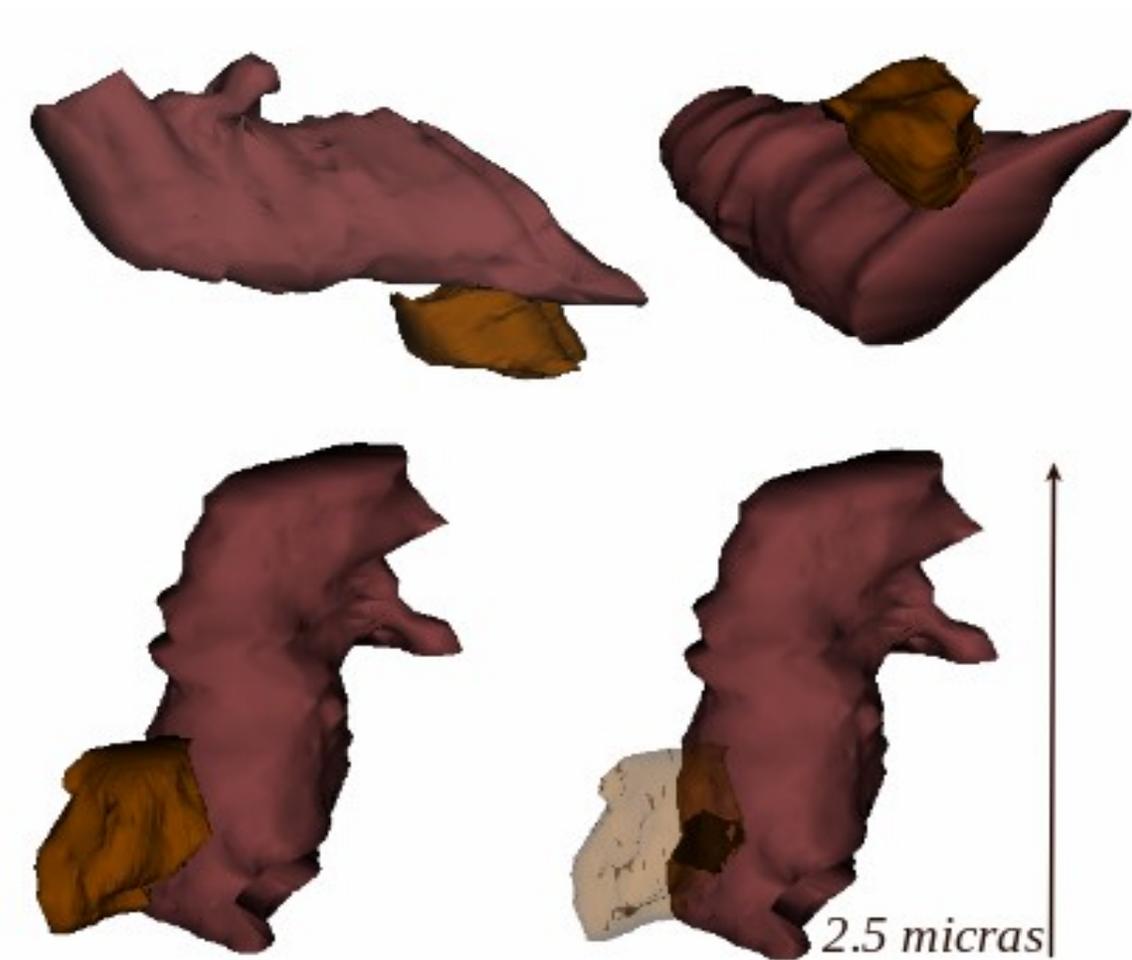


Figura 13. Reconstrucción tridimensional del SI de un axón (morado) de la CP mostrado en la figura previa. El SI está recibiendo una sinapsis axo-axónica (café) y se puede observar la especialización sináptica (representada en negro en la figura inferior derecha).

1.3 CP de animales intactos: una breve reseña y comparación con el material experimental obtenido

Como se ha mencionado, la CP presenta una división a manera de capas con diferencias importantes en los componentes que la constituyen. Más importante aún es que la diferencia estructural también refleja una diferencia funcional y una segregación de la información que recibe y que emite cada una de las regiones de la CP. Por lo anterior, se hace una breve descripción de la ultraestructura con el propósito de identificar los componentes celulares de las capas y las estructuras sinápticas, esto permitió llevar a cabo una comparación de los eventos

estructurales observados en tejidos control y en el material experimental.

En la figura 14 se observa una interacción entre una célula glial (astrocito) y un capilar, cuyo componente principal es una célula endotelial que está siendo envuelta por los procesos del astrocito. Esta micrografía corresponde a la capa I de la CP y en conjunto estos elementos conforman la barrera hematoencefálica que se encuentra en todos los vasos sanguíneos del SNC, a excepción de algunas áreas localizadas en la periferia de los ventrículos (Joly, et al. 2007).

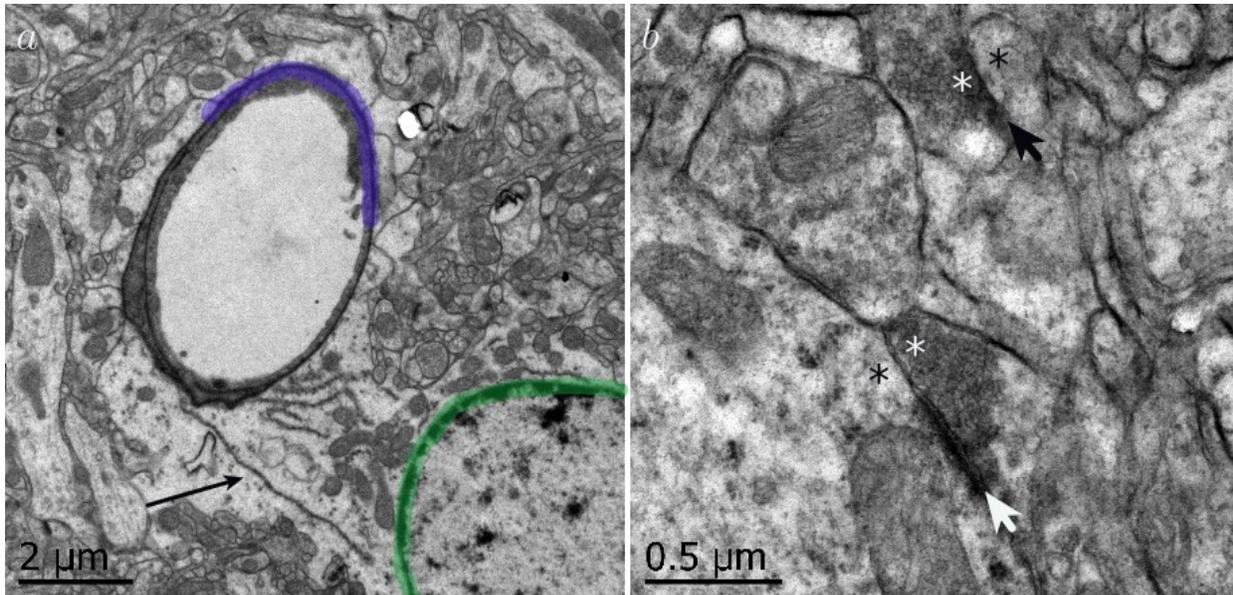


Figura 14. a. Astrocito (verde) en capa I de la CP envolviendo a una capilar (azul). La flecha señala un proceso del astrocito **b.** Sinapsis axo-espinosa (flecha negra) y axo-dendrítica (flecha blanca), los asteriscos señalan las estructuras pre-sinápticas (axón) contenidas con vesículas sinápticas (blanco) y los procesos post-sinápticos (negro).

En la misma figura se observa el neuropilo de la capa II de CP, en donde se muestran los dos tipos principales y más frecuentes de sinapsis observadas en el SNC y en la CP; la sinapsis axo-espinosa, que está conformada por un botón pre-sináptico (axón) y una espina dendrítica (post-sináptico) y la sinapsis axo-dendrítica que está formada por la misma estructura en la porción pre-sináptica que la anterior, pero en este caso la estructura post-sináptica es el eje dendrítico (Peters et al. 1976).

El conteo semi-cuantitativo de sinapsis en material de ratas intactas (ver sección de métodos) arrojó porcentajes de sinapsis axo-espinosas del ~67%, mientras que el número de sinapsis establecidas entre axones y ejes o diáfisis dendríticas fue del ~30%. La sinapsis axo-somática es

el evento estructural que menos fue observado y representa un ~2% del número total de sinapsis observadas.

Es prudente señalar que en ambas micrografías la ultraestructura se encuentra bien preservada, esto es aún más notorio en la figura 14a en la que se aprecia que los elementos que constituyen al neuropilo parecen “encajar” muy bien unos con otros, no hay retracción y las membranas están bien preservadas.

Esto es importante por que también notamos la ausencia de perfiles o procesos cuya estructura asemeje a botones en proceso de degeneración, situación que contrasta con el material experimental en donde hay presencia de dichos perfiles degenerados de manera frecuente y consistente. En la figura 15 se presenta una neurona piramidal (ubicada en la capa II) y algunos de sus organelos, el núcleo se encuentra en el borde superior de la figura.

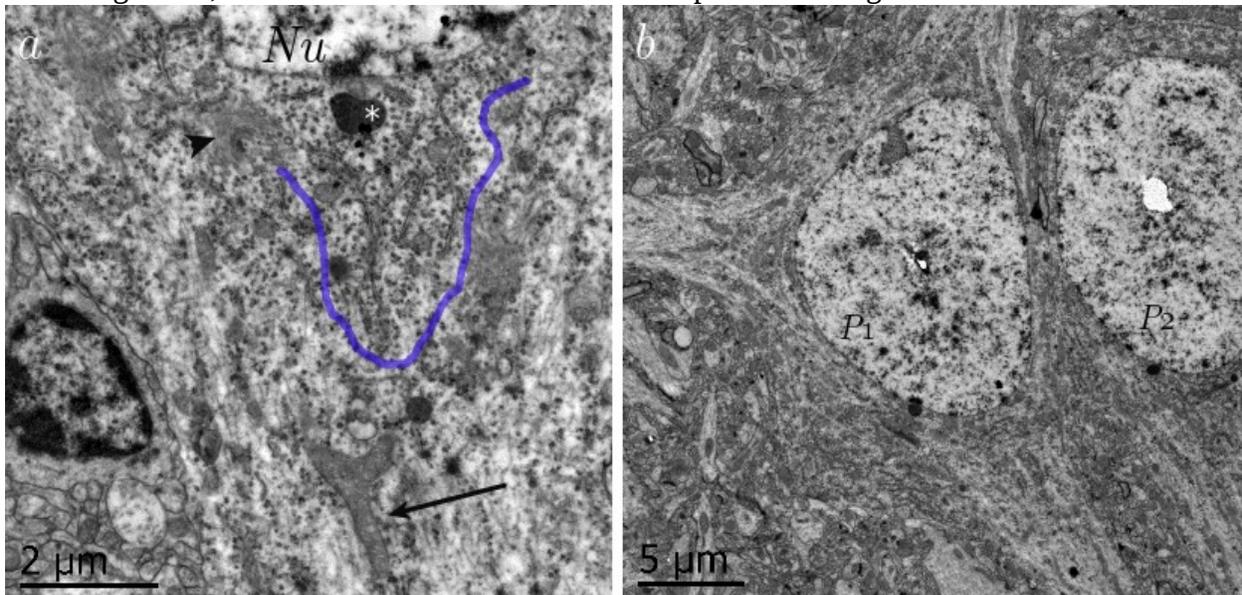


Figura 15. a. Neurona piramidal putativa y sus organelos: Nu: núcleo, asterisco: lisosoma, punta de flecha: Golgi, trazo azul: retículo endoplásmico rugoso, flecha: mitocondria. b. Dos neuronas piramidales (P1 y P2), en la neurona de la izquierda se observan los procesos dendríticos emanando del soma (P1).

Los lisosomas son cuerpos electrón-densos (asterisco) que contienen en su interior enzimas hidrolíticas, el trazo azul señala la región donde se encuentra el retículo endoplásmico rugoso o sustancia de Nissl, que está asociado a la síntesis de proteínas, la punta de flecha señala el complejo de Golgi, que consiste de una serie de vesículas aplanadas en donde las proteínas sufren

modificaciones post-traduccionales, y la flecha señala a una mitocondria en forma de Y, en este último organelo se lleva a cabo la fosforilación oxidativa, proceso que le otorga a la célula su principal fuente de energía.

También en la figura 15 se observan los somas de dos células piramidales de la capa II, y en una de ellas (izquierda) se pueden distinguir con claridad los procesos dendríticos emanando de la región peri-nuclear, nótese que los microtúbulos en el citoplasma de las dendritas confinan a los organelos asemejando a un triángulo, estas características (junto con el tamaño, ubicación etc...) permiten distinguir a las neuronas piramidales de otras poblaciones neuronales.

Finalmente, en la figura 16 se muestra otro panel que contiene 10 imágenes representativas de una serie de 44 cortes, la serie contiene la dendrita proximal de una neurona de la CP que recibe cuando menos 5 aferencias sinápticas, la reconstrucción tridimensional de dicha dendrita y sus aferencias se muestra en la figura 17.

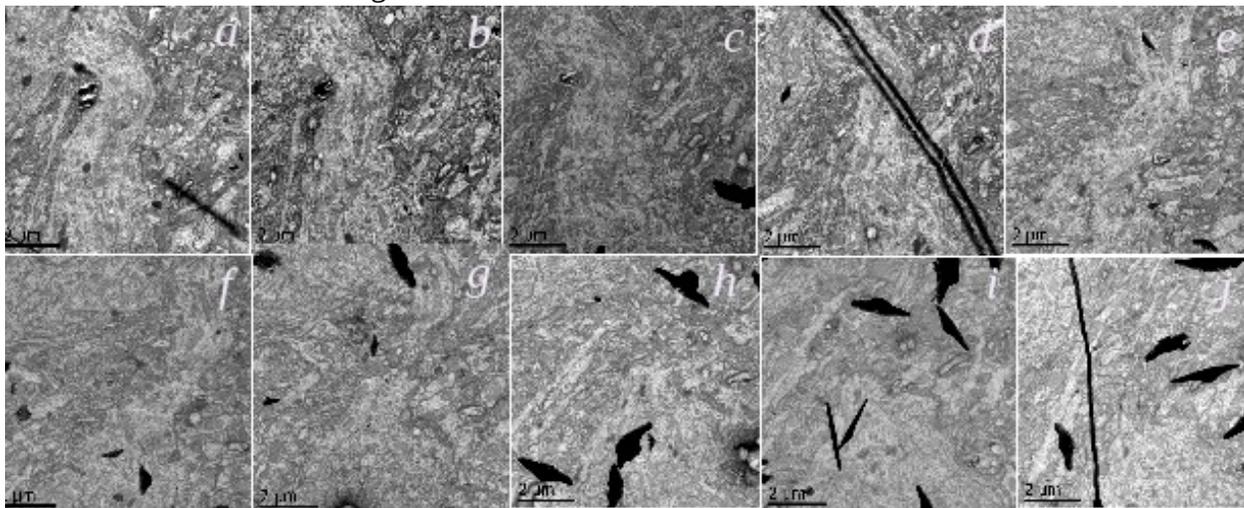


Figura 16. En el panel se muestran diez imágenes (a-j) que representan una serie de 44 cortes longitudinales a través de la dendrita proximal de una neurona en la CP.

Para llevar a cabo esta reconstrucción tridimensional se siguieron 44 cortes finos en el ME, durante el análisis de las micrografías no se encontraron procesos neuronales con características ultraestructurales distintivas de un proceso degenerativo, más aún, en los 2 animales cuya lesión no fue exitosa pero se prosiguió con el procesamiento del tejido y se llevó a cabo observación en el ME, tampoco se observaron procesos degenerados (imágenes no mostradas), éstas

observaciones indican que la lesión es selectiva y que al llevarla a cabo correctamente se genera un perfil morfológico identificable en los sitios de proyección de las neuronas lesionadas (p. ej. neuronas mitrales y/o empenachadas).

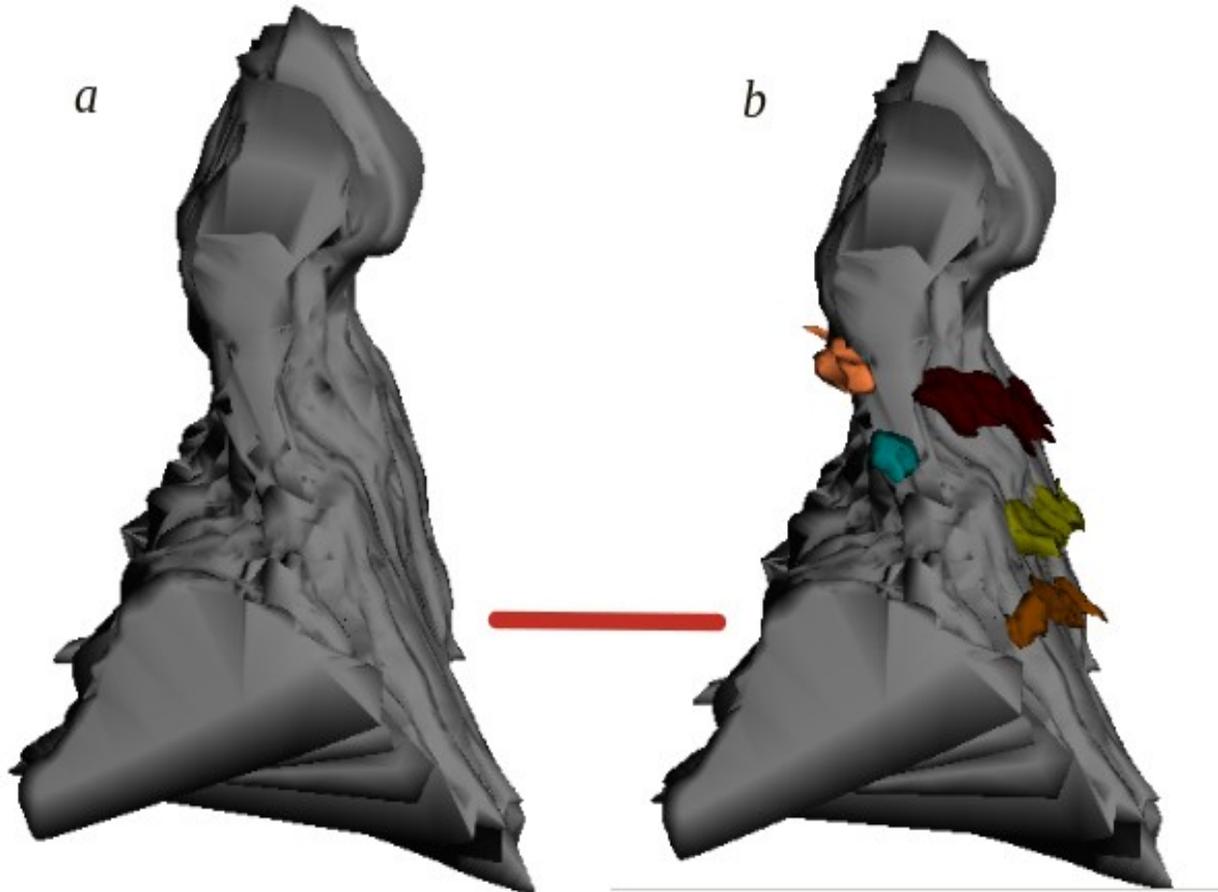


Figura 17. Reconstrucción tridimensional hecha a partir de una serie de 44 cortes en CP. En a) se observa una dendrita proximal, mientras que en b) se muestra la misma con las aferencias que recibe. La línea roja divide la región somática de la dendrita. El grosor es de $3.5 \mu\text{m}$.

La ausencia de perfiles neuronales degenerados a lo largo de los más de 40 cortes que componen a esta imagen nos permite sugerir que la presencia de botones degenerados en dendritas proximales de material experimental (p. ej. ratas que recibieron lesión en el BO) puede corresponder o representar algunas de las aferencias recibidas por la dendrita reconstruida.

VIII. DISCUSIÓN

El sistema olfativo es una de las modalidades sensoriales que le permite a los individuos llevar a cabo interacciones ecológicas, esto es, procesos continuos de intercambio de información con otros individuos (ya sea de la misma especie o de una distinta) y el mundo físico que los rodea. Ha sido gracias a este tipo de interacciones que la vida en general ha podido subsistir a través del tiempo, pues es absolutamente necesario para el mantenimiento de la misma que cualquier tipo de organismo (desde una simple célula hasta el ser humano) tenga la capacidad de obtener información acerca de su entorno. Los procesos evolutivos han producido una serie de mecanismos de interacción entre las células y el ambiente que los rodea, de modo que han surgido “sensores” de distintos tipos que le permiten al portador recibir y procesar estímulos (energía) de diferentes características y en consecuencia responder (con movimiento o secreción) ante tal estimulación.

Una de las modalidades sensoriales que le permite a los individuos recibir y procesar estímulos de naturaleza química es el sentido del olfato (la otra modalidad es el gusto). El “ambiente olfativo” es fundamental para algunos de los procesos biológicos importantes como la conducta sexual, la alimentación y la identificación de depredadores (Belluscio et al. 1998; Mandiyan et al. 2005), por tal motivo, la correcta identificación de estos estímulos y la relación que tienen con los aspectos biológicos mencionados es de gran importancia.

Las estructuras encargadas de recibir y procesar la información de los odorantes en el ambiente son; (de la periferia al SNC) el EO, el BO y las regiones corticales que reciben aferencias de este último (NOA, TO, CP, Am y CE). Como ya se ha mencionado, a excepción de la CE todas son cortezas (estructuras organizadas a manera de capas) filogenéticamente antiguas que en conjunto han sido designadas con el término *paleocorteza*. Esta nomenclatura implica -aparentemente- un nivel de complejidad menor que el de la isocorteza (neocorteza), tanto en la organización celular como en la funcional. Además, es importante mencionar que con el desarrollo de la última la *paleocorteza* ha disminuido su tamaño relativo, por lo que en el ser humano ocupa una pequeña porción de la región medial-ventral del lóbulo temporal, cerca de la circunvolución del

hipocampo, mientras que en otros vertebrados, como los peces, anfibios y reptiles, la paleocorteza ocupa un porcentaje significativo de la masa encefálica (Brodal, 1981).

El estudio de la *paleocorteza*, y en particular de la CP ha atraído cada vez más atención de los investigadores por varias razones; en roedores es una estructura cortical accesible a la manipulación y experimentación incluso en condiciones *in vivo* (Schoenbaum y Eichenbaum 1995; Stettler y Axel 2009), es un modelo relativamente simple de procesamiento cortical y las características de las representaciones internas generadas en la vía olfativa aún se desconocen en gran medida, sobre todo si se toma en cuenta el conocimiento que se ha producido en otras modalidades como la visión, el oído o la sensación somática. Por tal motivo, estudiar el procesamiento de información que lleva a cabo el sistema olfativo es de gran interés, ya que además de la información faltante, las representaciones neuronales generadas deben construirse en base a estímulos que no tienen un orden determinado en el espacio, y a pesar de esto, es posible generar mediante su percepción aprendizajes y conductas que promueven la supervivencia.

Los estudios electrofisiológicos recientes han generado información valiosa acerca de aspectos puntuales del procesamiento llevado a cabo en la CP (Franks et al. 2011; Poo e Isaacson, 2009 y 2011; Rennaker et al. 2007; Suzuki y Bekkers, 2006, 2011 y 2012). Sin embargo, en todos ellos se asume que las aferencias de la CP que provienen del BO solamente se distribuyen, y por ende establecen contactos sinápticos en la capa Ia con dendritas distales de neuronas cuyos somas se ubican en porciones más profundas (Fig. 18). Este modelo de conectividad fue propuesto en base al trazado de la vía olfativa con isótopos radioactivos (contenidos en aminoácidos) incorporados de manera activa a las neuronas (Price, 1973).

La interpretación de los resultados produjo la conclusión arriba mencionada; los axones emitidos por el TOL establecen contactos sinápticos únicamente con procesos neuronales en capa Ia. El análisis estructural de la vía anatómica a través de la observación a nivel del microscopio óptico reveló dicha organización, sin embargo, estudios de mayor resolución no fueron hechos y esta noción no ha sido debatida desde entonces.

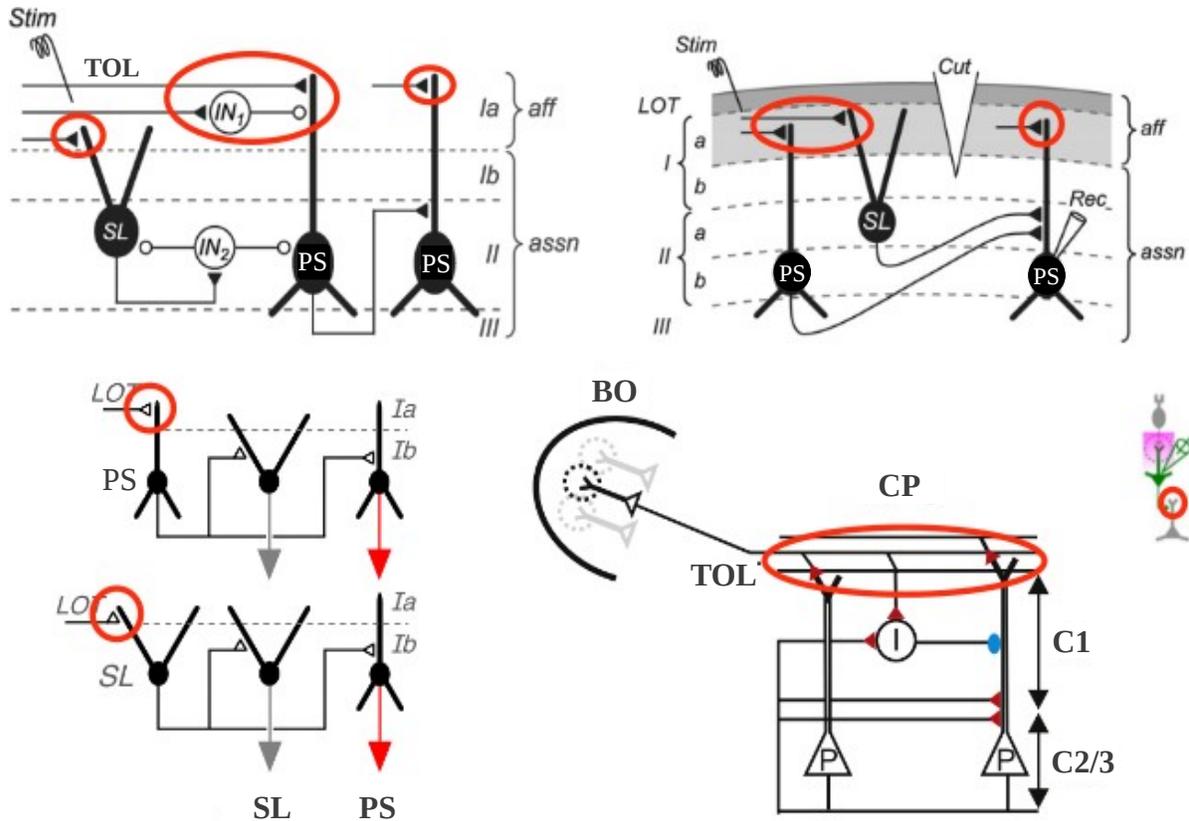


Figura 18. Esquema representativo del consenso que existe acerca de la conectividad entre el BO y la CP (círculos rojos). Los registros hechos en rebanadas de CP asumen esta organización, por lo que la interpretación y explicación de los resultados obtenidos se basa en esta distribución de las aferencias sensoriales. *Modificado de (Davison y Ehlers, 2011; Poo e Isaacson, 2009; Suzuki y Bekkers, 2006, 2011 y 2012).*

Los resultados mostrados en este trabajo demuestran que las aferencias provenientes del BO no se encuentran restringidas a la porción superficial de la primera capa, es decir, a la capa Ia. Más aún, la presencia de botones sometidos a un proceso degenerativo (por efecto de la lesión del BO) fue observada en regiones más profundas de lo que se tenía establecido (p. ej. capa II). Se encontraron botones degenerados asociados a cuerpos de neuronas ubicadas en capa II y también se determinó esta asociación entre botones degenerados y dendritas proximales de neuronas piramidales (Figs. 8 y 9).

La conclusión de que estos procesos neuronales degenerados tienen un origen bulbar y por ende corresponden a los axones de la neuronas de proyección -lesionadas- de este último está basada en lo que a continuación se expone: la frecuencia de los botones degenerados (Fig. 8b) en un área

determinada de tejido es mayor a la que uno esperaría encontrar de manera natural, es decir, la frecuencia de eventos degenerativos por procesos naturales (p. ej. no provocados por lesiones) es menor a la observada en este material (ver resultados de tejidos de ratas intactas); la confirmación de la lesión por medios histológicos (Fig. 4) avala la sugerencia de que los botones observados en la CP son de origen bulbar, sin mencionar el conocimiento que se tiene de que las neuronas principales del BO envían su axones –a través del TOL- a la CP.

Finalmente, el propio tejido observado al ME proporciona un control interno, es decir, la presencia de botones degenerados en proximidad con otros procesos neuronales estructuralmente intactos (membranas, organelos, vesículas etc..) apoya aún más la sugerencia de que los botones degenerados pertenecen a las neuronas mitrales y/o empenachadas lesionadas en el BO y que lo observado no es un artefacto producido por una mala perfusión.

Evidentemente, la proposición de un esquema de conectividad distinto al establecido puede tener implicaciones funcionales para el procesamiento y la representación de la información odorífera. En primera instancia, podría pensarse que la capacidad de las neuronas de proyección del BO de establecer contactos sinápticos con regiones más cercanas (p. ej. soma o dendritas proximales) al sitio de integración redundaría en una influencia mayor de estas últimas para producir (reclutar) la actividad de las neuronas eferentes del sistema al que proyectan (CP).

Un estudio reciente hecho con el objetivo de determinar las características de integración sináptica de las neuronas principales de la CP, concluye que independientemente de la localización dendrítica de la entrada sináptica (tomando en cuenta que éstas no se distribuyen más allá de capa Ia), la “potencia” de las aferencias bulbares es homogénea y éstas se distribuyen de manera difusa en el árbol dendrítico distal. Además también determinaron que la presencia de espigas locales en la dendritas tiene un efecto prácticamente despreciable sobre la generación de potenciales de acción (Bathellier et al. 2009).

En dicho trabajo, se demuestra que al aplicar corriente despolarizante en las diversas regiones dendríticas de las neuronas principales de la CP, solamente se evocan potenciales de acción en el soma cuando la inyección de corriente se lleva a cabo en regiones contenidas en la parte profunda de la capa Ib en adelante (p. ej. capa II) (Fig 19). La interpretación es la siguiente; para que impulsos provenientes del BO puedan evocar potenciales de acción en el soma, es necesario que se hagan contactos sustantivos y distribuidos en el árbol dendrítico apical, puesto que si los contactos son espacialmente cercanos, se lleva a cabo una sumación sublineal de los mismos (Bathellier et al., 2009, Tamás et al. 2002).

Franks e Isaacson (2006) demostraron que ante la estimulación mínima de las fibras del TOL, un solo axón en algunas ocasiones es capaz de tener un impacto considerable sobre el disparo de neuronas piramidales individuales, a diferencia de lo propuesto por Bathellier y colaboradores, argumentaron que la coincidencia espacial de algunos cuantos axones activos es suficiente para generar potenciales de acción en las neuronas piramidales.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden conciliar con estos dos puntos de vista, pues la observación de las sinapsis “fuertes” establecidas por axones únicos emitidos por el TOL podría explicarse con la aceptación de que las fibras provenientes del BO (contenidas en el TOL) son capaces de establecer contactos sinápticos directamente con el soma o con dendritas proximales, contribuyendo así en mayor grado a la generación de potenciales de acción por parte de las neuronas principales de la CP.

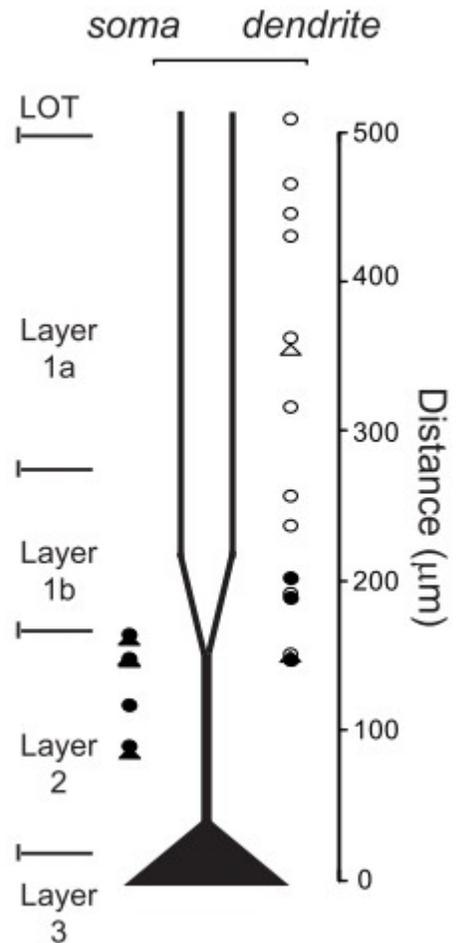


Figura 19. Diagrama representativo de la actividad neuronal evocada por inyecciones de corriente en distintas regiones dendríticas. Los símbolos blancos representan las zonas estimuladas en las que no se pudo evocar espigas somáticas, mientras que los símbolos negros indican que hubo espigas somáticas. La posición (p. ej. izq. o der.) de los símbolos denota en que región se generó primero la espiga, los triángulos representan neuronas semilunares y los círculos neuronas piramidales. Tomado de (Bathellier et al. 2009).

Los experimentos hechos por Williams y Stuart (2002) demuestran que la amplitud de los PEPS's unitarios en el soma declina de manera exponencial conforme la entrada sináptica se aleja del mismo, esto último permite sugerir que las entradas sinápticas establecidas en regiones muy lejanas al soma tienen un efecto mínimo para generar potenciales de acción.

El reporte de que las espigas locales generadas en la capa Ia de la CP tienen también una pobre influencia sobre el disparo de las neuronas (Bathellier et al. 2009) invita a pensar en la posibilidad de que los botones degenerados observados en asociación con cuerpos neuronales y dendritas proximales en capa II, sean capaces de establecer contactos sinápticos que influyan en el disparo de las neuronas, y por qué no, incluso representar el sustrato anatómico de las sinapsis “fuertes” establecidas por fibras únicas del TOL (Franks e Isaacson, 2006). Esto último no descalifica la posibilidad de que se pueda reclutar a las neuronas principales de la CP a través de los mecanismos propuestos por Bathellier, simplemente es una opción más para explicar los fenómenos observados.

Finalmente, se hace alusión a la observación de que los botones en proceso de degeneración frecuentemente están asociados a botones sinápticos estructuralmente intactos con contenido vesicular y vesículas grandes densas (Fig. 10), esta interacción estructural sugiere la existencia de un control endógeno de la información sensorial proveniente del BO, es decir, un mecanismo de modulación pre-sináptica como el que se conoce en la médula espinal y que implica un control que ejercen las neuronas intrínsecas de ésta para modular la información conducida por las aferentes primarias.

Sin embargo esta sugerencia debe tomarse con cautela, pues si bien es cierto que la asociación estructural es un hecho, se debe hacer un estudio más sistematizado de dicho fenómeno, además es necesario poder determinar sin ambigüedad la existencia de las especializaciones estructurales que caracterizan a las sinapsis, es decir, los engrosamientos sinápticos. Como ya se mencionó en la sección de los antecedentes, cuando se llevan a cabo estudios de conectividad mediante la lesión de regiones cerebrales, es imperativo poder identificar los engrosamientos sinápticos del proceso no degenerado para poder afirmar que una interacción sináptica fue llevada a cabo entre

el proceso degenerado y el intacto.

Por otro lado, es prudente mencionar también que en regiones corticales (tanto de isocortezas como de paleo y arquicortezas) no han sido observadas interacciones sinápticas entre dos botones terminales (Merchan-Pérez et al. 2009). Sin embargo, la naturaleza filogenéticamente antigua de la CP y las peculiaridades de la vía anatómica (pocas sinapsis hasta llegar a CP y falta de relevo sináptico en el tálamo) pueden representar una etapa o mecanismo de procesamiento con diferentes características a las observadas en otras regiones corticales, por lo que no se puede descartar la existencia de dicho mecanismo.

Con relación a los procesos neuronales inmunoreactivos a GABA, se pudo observar que éstos establecen contactos sinápticos en la mayoría de las ocasiones con los ejes dendríticos o diáfisis de las dendritas (Fig. 11). Esta observación va de acuerdo con la información general que se tiene de la frecuencia de los sitios de contacto sináptico en función del tipo neuronal, es decir, se sabe que las neuronas principales (generalmente excitatorias) establecen contactos sinápticos en la mayoría de las ocasiones con espinas dendríticas, mientras que las neuronas intrínsecas o interneuronas (generalmente inhibitorias) hacen lo propio en la región peri-somática, diáfisis de las dendritas y SI (Peters et al. 1976).

Es preciso mencionar que la identificación de las aferencias intrínsecas de la CP (p. ej. neuronas inmunoreactivas a GABA que establecen contactos sinápticos con neuronas principales) fue en gran medida impedida por una serie de limitaciones y/o problemas técnicos, cómo el pobre marcaje de los anticuerpos y la incapacidad de los mismos de penetrar más allá de unas 5 μm en el tejido, por esta razón los cortes finos obtenidos en el ultramicrotomo debían ser hechos sin rebajar mucho el bloque de corte, la ubicación de las regiones superficiales del mismo, y por ende de los sitios donde había marcaje se advertía por las indentaciones generadas en el tejido al momento de cortarlo en el vibratomo (ver métodos y Fig. 5), de manera inevitable hubo ocasiones en las que el tejido fue rebajado y la zona de reactividad a los anticuerpos fue eliminada.

A pesar de lo anterior, el estudio de tejido de CP proveniente de animales control reveló la presencia de contactos sinápticos axo-axónicos establecidos entre un botón terminal (porción pre-sináptica) y el SI (porción post-sináptica) de neuronas en capa II. Esta observación de igual forma permite sugerir a estas interacciones estructurales como el correlato ultraestructural de estudios previos hechos a un nivel de resolución menor, como el de Larriva-Sahd (2010), en donde fue reportada la morfología de neuronas típicamente reconocidas como “candelabros” y sus relaciones anatómicas con neuronas piramidales, cuya principal característica es la presencia de las terminales sinápticas en forma de candelabro rodeando el SI; este mismo año fue publicado un trabajo que apoya estas observaciones, ya que por medio de la visualización de anticuerpos específicos para estos dos tipos de procesos neuronales (SI y terminales en candelabro) se confirmó la presencia de sinapsis axo-axónicas establecidas por neuronas en “candelabro” en la CP (Wang y Sun, 2012).

Como comentario final, se hace énfasis en las observaciones estructurales reportadas, en donde se propone que las aferencias de la CP provenientes del BO se distribuyen en regiones más profundas de lo que se tenía establecido, de modo que se encuentran asociadas a somas y dendritas proximales de neuronas piramidales putativas, esta relación estructural permite sugerir interacciones sinápticas que en principio tendrían un efecto mayor sobre la generación de potenciales de acción, de modo que también es probable que los resultados electrofisiológicos ya discutidos tengan que ser re-interpretados asumiendo este reporte.

IX. CONCLUSIONES

- Las aferencias de la CP provenientes del BO se distribuyen en regiones más profundas de lo que se ha reportado (p. ej. la capa II).
- Los botones en proceso de degeneración fueron observados en asociación con somas y dendritas proximales en la capa II de CP.
- Se propone la existencia de sinapsis establecidas entre fibras emitidas por el TOL y cuerpos neuronales y dendritas proximales en la CP.
- Se sugiere que la presencia de botones degenerados en capa II es un correlato anatómico-ultraestructural de las “sinapsis fuertes” reportadas por Franks e Isaacson en el 2006.
- Las sinapsis establecidas por las neuronas inmunoreactivas a GABA se observaron con mayor frecuencia en las diáfisis dendríticas y también se muestra el correlato ultraestructural de las sinapsis axo-axónicas reportadas en la CP (Larriva-Sahd, 2010; Wang y Sun, 2012).
- La evidencia anatómica obtenida aporta información valiosa que amerita la re-interperetación de la conectividad del BO a la CP

X. REFERENCIAS

- Andersen, P., Silfvenius, H., Sundberg, S. H. & Sveen, O. 1980. A comparison of distal and proximal dendrite synapses on CA1 pyramids in guinea pig hippocampal slices in vitro. *J. Physiol. (Lond.)*. 307: 273–299.
- Bathellier, B., Margrie, T. & Larkum, M. 2009. Properties of Piriform Cortex Pyramidal Cell Dendrites: Implications for Olfactory Circuit Design. *J. Neurosci* . 29: 12641–12652.
- Belluscio, L., Gold, G., Nemes, A. & Axel, R. 1998. Mice deficient in *Golf* are anosmic. *Neuron* 20: 69-81.
- Buck, L. & Axel, R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*. 65: 175-187.
- Buck, L. 1996. Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu Rev. Neurosci* 19: 517-544.
- Brodal, A. 1981. The Olfactory Pathways. En: *Neurological Anatomy*. Editado por Brodal, A. Oxford University Press, Nueva York. Pp. 640-644.
- Calleja, C. 1893. La región olfatoria del cerebro. Madrid. Imprenta y Librería de Nicolás Moya. *Ann. Soc. Espan. Hist. Nat.*, T. 2, Madrid. Pp. 1-38.
- Cash, S. & Yuste, R. 1999. Linear Summation of Excitatory Inputs by CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron*. 22: 383–394.
- Davison, I. & Ehlers, M, 2011. Neural circuit mechanisms for pattern detection and feature combination in olfactory cortex. *Neuron* 70: 82–94.
- Ebbesson, S. 1970. The selective silver-impregnation of degenerating axons and their synaptic endings in Nonmammalian species. En: *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*. Editado por Nauta, W. & Ebbesson, S. Springer-Verlag. Nueva York. Pp. 132-162.
- Franks K.M., & Isaacson, J.S. 2006. Strong single-fiber sensory inputs to olfactory cortex: implications for olfactory coding. *Neuron*. 49: 357–363.
- Franks, K.M., Russo, M.J., Sosulski, D.L., Mulligan, A.A., Siegelbaum, S.A. & Axel, A. 2011. Recurrent circuitry dynamically shapes the activation of piriform cortex. *Neuron* 72: 49–56.
- Gray, E.G. & Hamlyn, L.H. 1962. Electron microscopy of experimental degeneration in the avian optic tectum. *J. Anat. (Lond)*. 96: 309-316.
- Haberly, L. 2001. Parallel-distributed Processing in Olfactory Cortex: New Insights from Morphological and Physiological Analysis of Neuronal Circuitry. *Chem. Senses* 26: 551-576.

- Haberly, L. & Price, J.L. 1977. The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. *Brain Res.* 129: 152-157.
- Haberly, L. & Price, J.L. 1978. Association and commissural fibers of the olfactory cortex of the rat. I. Systems originating in the piriform cortex and adjacent areas. *J Comp Neurol.* 178: 711-740.
- Illig, K.R. & Haberly, L.B. 2003. Odor-evoked activity is spatially distributed in piriform cortex. *J Comp Neurol.* 457: 361–373
- Johnson, D., Illig, K., Behan, M. & Haberly, L. 2000. New features of connectivity in piriform cortex visualized by intracellular injection of pyramidal cells suggest that “Primary” olfactory cortex functions like “Association” cortex in other sensory systems. *J. Neurosci.* 20: 6974-6982.
- Joly, J-S., Osório, J., Alunni, A., Auger, H., Kano, S. & Rétaux, S. 2007. Windows of the brain: Towards a developmental biology of circumventricular and other neurohemal organs. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18: 512-524.
- Kang, N., Baum, M. & Cherry, J. 2011. Different Profiles of Main and Accessory Olfactory Bulb Mitral/Tufted Cell Projections Revealed in Mice Using an Anterograde Tracer and a Whole-Mount, Flattened Cortex Preparation . *Chem. Senses.* 36: 251–260.
- Kristensson, K. & Olsson, Y. 1971. Retrograde axonal transport of protein. *Brain Res.* 29: 363-365.
- 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.
- Larriva-Sahd J. 2010. Chandelier and interfascicular neurons in the adult mouse piriform cortex. *Front Neuroanat .* 4: 1-7.
- Larriva-Sahd, J., Gorski, R.A. & Micevych, P.E. 1986. Cholecystokinin synapses in the sexually dimorphic central part of the medial preoptic nucleus. *Exp Neurol.* 92: 639-650.
- Larriva-Sahd, J., Rondán-Zarate, A. & Ramírez-Degollado, M. 1985. Sexually dimorphic contribution from the fornix to the ventromedial hypothalamic nucleus: A quantitative electron microscopic study. *Neuroscience Letters.* 200: 147-150.
- LaVail, J. & LaVail, M. 1974. The retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system: A light and electron microscopic study. *J Comp Neurol.* 157: 303-358.
- Lledo, P-M., Gheusi, G. & Vincent, J-D. 2005. Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev.* 85: 281-317.

- Luskin, M. & Price, J.L. 1983a. The Laminar Distribution of Intracortical Fibers Originating in the Olfactory Cortex of the Rat. *J Comp Neurol.* 216: 292-302.
- Luskin, M. & Price, J.L. 1983b. The Topographic Organization of Associational Fibers of the Olfactory System in the Rat, Including Centrifugal Fibers to the Olfactory Bulb. *J Comp Neurol.* 216: 264-291.
- Magee, J. 2000. Dendritic Integration of Excitatory Synaptic Input. *Nature Reviews Neuroscience.* 1: 181-190.
- Mandiyan, V.S., Coats, J.K. & Shah, N. 2005. Deficits in sexual and aggressive behaviors in Cnga2 mutant mice. *Nature Neurosci.* 8: 1660-1662.
- Merchan-Pérez, A., Rodríguez, J., Ribak, C. & DeFelipe, J. 2009. Proximity of excitatory and inhibitory axon terminals adjacent to pyramidal cell bodies provides a putative basis for nonsynaptic interactions. *Proc Natl Acad Sci.* 106: 9878-9883.
- Mesulam, M. 1982. Principles of Horseradish Peroxidase Neurohistochemistry and their applications for Tracing Neural Pathways -Axonal Transport, Enzyme Histochemistry and Light Microscopic Analysis. En: Tracing Neural Connections with Horseradish Peroxidase. Editado por Mesulam, M. IBRO Handbook series: method in the neurosciences. Great Britain. Pp. 1-152.
- Mesulam, M. & Rosene, D. 1979. Sensitivity in horseradish peroxidase Neurohistochemistry: A comparative and quantitative study of nine methods. *J Histochem Cytochem.* 27: 763-763.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J. & Axel, R. 1996. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell.* 87: 675-686.
- Morcuende, S., Delgado-García, J. & Ugolini, G. 2002. Neuronal pre-motor networks involved in eyelid responses: retrograde transneuronal tracing with rabies virus from the orbicularis oculi muscle in the rat. *J. Neurosci.* 22: 8808-8818.
- Mori, K., Mataga, N. & Imamura, K. 1992. Differential specificities of single mitral cells in rabbit olfactory bulb for a homologous series of fatty acid odor molecules. *J Neurophysiol.* 67: 786-789.
- Mori, K., Nagao, H. & Yoshihara, Y. 1999. The Olfactory Bulb: Coding and Processing of Odor Molecule Information. *Science.* 286: 711-715.
- Ojima, H., Mori, K. & Kishi, K. 1986. The trajectory of mitral cell axons in the rabbit olfactory cortex revealed by intracellular HRP injection. *J Comp Neurol.* 230: 77-87.
- O'Leary, J.L. 1936. Structure of the Primary Olfactory Cortex. *J Comp Neurol.* 67: 1-31.
- Paredes, R.G. & Larriva-Sahd, J. 2010. Medullary neurons in the core whitematter of the olfactory

bulb: a new cell type. *Cell Tissue Res.* 339: 281-295.

- Paxinos, G. & Watson, C. 1982. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- Peters, A., Palay, S. & Webster, H. 1976. Synapses. En: *The fine structure of the nervous system: the neurons and the supporting cells*. Editado por Peters, A., Palay, S. & Webster, H. W. B. Saunders Company Pp. 118-180.
- Poo, C. & Isaacson, J. 2009. Odor representations in olfactory cortex: “sparse coding”, global inhibition and oscillations. *Neuron*. 62: 850–861.
- Poo, C. & Isaacson, J. 2011. A major role for intracortical circuits in the strength and tuning of odor-evoked excitation in olfactory cortex. *Neuron*. 72: 41–48.
- Price, J.L. 1968. The termination of centrifugal fibers in the olfactory bulb. *Brain Res.* 7: 483-486.
- Price, J.L. 1969. The origin of the centrifugal fibers to the olfactory bulb. *Brain Res.* 14: 542-545.
- Price, J.L. 1973. An Autoradiographic Study of Complementary Laminar Patterns of Termination of Afferent Fibers to the Olfactory Cortex. *J Comp Neurol.* 150: 87-108.
- Rall, W. 1967. Distinguishing Theoretical Synaptic Potentials computed for different Soma-Dendritic Distributions of Synaptic Input. *J. Neurophysiol.* 30: 1138-1168
- Rennaker, R.L., Chen, C.-F.F., Ruyle, A.M., Sloan, A.M. & Wilson, D.A. 2007. Spatial and temporal distribution of odorant-evoked activity in the piriform cortex. *J Neurosci.* 27: 1534–1542.
- Schoenbaum, G. & Eichenbaum, H. 1995. Information coding in the rodent prefrontal cortex. I. Single-neuron activity in orbitofrontal cortex compared with that in the pyriform cortex. *J Neurophysiol.* 74: 733-750.
- Somogyi, P., Hodgson, A.J. & Smith, D. 1979. An approach to tracing neural networks in the cerebral cortex and basal ganglia, combination of Golgi staining, retrograde transport of horseradish peroxidase and anterograde degeneration of synaptic boutons in the same material. *Neuroscience*, 4: 1805-1852.
- Sosulski, D., Bloom, M., Cutforth, L., Axel, R. & Data, S. 2011. Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. *Nature.* 472: 213-216.
- Stettler, D. & Axel, R. 2009. Respresentations of odor in the Piriform Cortex. *Neuron.* 63: 854-864.
- Suzuki, N. & Bekkers, J. 2006. Neural coding by two classes of principal cells in the mouse

Piriform Cortex. *J Neurosci.* 26: 11938–11947.

- Suzuki, N. & Bekkers, J.M. 2011. Two layers of synaptic processing by principal neurons in piriform cortex. *J Neurosci.* 31: 2156–2166.
- Suzuki, N. & Bekkers, J. 2012. Microcircuits Mediating Feedforward and Feedback Synaptic Inhibition in the Piriform Cortex. *J Neurosci.* 32: 919–931.
- Tamás, G., Szabadics, J. & Somogyi, P. 2002. Cell type and subcellular position dependent summation of unitary postsynaptic potentials in neocortical neurons. *J Neurosci.* 22: 740–747.
- Tamás, G. & Szabadics, J. 2004. Summation of Unitary IPSPs Elicited by Identified Axo-axonic Interneurons. *Cereb Cortex.* 14: 823–826.
- Ugolini, G. 2009. Advances in viral transneuronal tracing. *J Neurosci Methods.* 194: 2-20.
- Valverde, F. 1965. Studies on the Piriform Lobe. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Wang, X. & Sun, Q. 2012. Characterization of Axo-Axonic Synapses in the Piriform Cortex of *Mus musculus*. *J Comp Neurol.* 520: 832–847.
- Westrum, L. 1970. Observations on initial segments of axons in the prepyriform cortex of the rat. *J Comp Neurol.* 139: 337-356.
- Williams, S. & Stuart, G. 2002. Dependence of EPSP Efficacy on Synapse Location in Neocortical Pyramidal Neurons. *Science.* 295: 1907-1910.
- Zinyuk, L., Datiche, F. & Cattarelli, M. 2001. Cell activity in the anterior piriform cortex during an olfactory learning in the rat. *Behavioural Brain Res.* 124: 29-32.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.....Áreas cerebrales que reciben aferencias del BO (p. 1)
- Figura 2.....Tinción de toluidina donde observan las capas de la CP (p. 6)
- Figura 3.....Dibujo que muestra la ubicación de la regiones olfativas en el encéfalo del roedor (p.10)
- Figura 4.....Tinción de Nissl donde se muestra un BO lesionado y uno intacto (p. 33)
- Figura 5.....Proceso de obtención de cortes finos para ME (p. 34)
- Figura 6.....Degeneración anterógrada de neuronas principales de BO (p. 35)
- Figura 7.....Inmunoreactividad a GABA en capa II de CP (p. 36)
- Figura 8.....Botones degenerados asociados a somas en capa II de CP (p. 37)
- Figura 9.....Botones degenerados asociados a dendritas proximales en capa II de CP (p. 38)
- Figura 10.....Botones degenerados asociados a botones estructuralmente intactos (p. 38)
- Figura 11.....Aferencias inmunoreactivas a GABA dentro de la CP (p. 39)
- Figura 12.....Panel representativo de 30 cortes seriados del SI (p. 40)
- Figura 13.....Reconstrucción tridimensional del SI (p. 41)
- Figura 14.....Barrera hematoencefálica y sinapsis en CP (p. 42)
- Figura 15.....Neuronas piramidales en capa II de CP (p. 43)
- Figura 16.....Panel representativo de 44 cortes seriados de una dendrita proximal de neurona piramidal en capa II (p. 44)
- Figura 17.....Reconstrucción tridimensional de la dendrita (p. 45)

- Figura 18.....Esquema actual de la conectividad entre BO y CP (p. 48)
- Figura 19.....Actividad evocada por inyecciones de corriente en distintos niveles de dendritas de neuronas piramidales en CP (p. 50)