



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE NEURONAS OLFATORIAS
OBTENIDAS DE PACIENTES CON TRASTORNO BIPOLAR O ESQUIZOFRENIA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

HÉCTOR SOLÍS CHAGOYÁN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. GLORIA ACACIA BENÍTEZ KING
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: Dr. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
Dra. MARCIA HIRIART URDANIVIA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D.F. AGOSTO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE NEURONAS OLFATORIAS
OBTENIDAS DE PACIENTES CON TRASTORNO BIPOLAR O ESQUIZOFRENIA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

HÉCTOR SOLÍS CHAGOYÁN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. GLORIA ACACIA BENÍTEZ KING
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: Dr. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
Dra. MARCIA HIRIART URDANIVIA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D.F. AGOSTO DE 2013

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina , en su sesión ordinaria del día 22 de abril de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **SOLIS CHAGOYÁN HÉCTOR** con número de cuenta 89331660 con la tesis titulada **“CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE NEURONAS OLFATORIAS OBTENIDAS DE PACIENTES CON TRASTORNO BIPOLAR O ESQUIZOFRENIA”**, realizada bajo la dirección de la **DRA: GLORIA ACACIA BENÍTEZ KING:**

Presidente: DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN
Vocal: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEGARAY
Secretario: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA
Suplente: DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO
Suplente: DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 09 de agosto de 2013



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación que me brindó durante mis estudios para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el donativo 86863 del Fondo de Salud.

Agradezco a la Dra. Gloria Acacia Benítez King por la acertada dirección de mi tesis, a la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia y al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez por su valiosa asesoría.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco al Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” por apoyar el proyecto con la clave: IC092010.0.

Agradezco a Agustín Riquelme y a Cristina Zepeda Gurrola por su invaluable apoyo experimental para obtener los resultados de las figuras 3 y 4.

Agradezco a Aline y a Marce por su cariño y su gran paciencia.

DEDICATORIA

A Mariana sin duda

A Alejandro y Erandi por llegar

A Víctor y Alejandra por su alegría y por contagiarme las ganas de continuar

A Margarita y Jesús por su apoyo a lo largo de toda la vida

A mis tíos Irais y José por haber sido los primeros motores

ÍNDICE

1. RESUMEN	13
2. ABSTRACT	15
3. INTRODUCCIÓN	17
3.1 Alteraciones anatómico estructurales en el sistema nervioso central en pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia	20
3.2 El citoesqueleto y las enfermedades psiquiátricas	21
3.3 Alteraciones en le vía de integración de la información olfatoria en los pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia	23
3.4 Mecanismo neurobiológico implicado en la transducción olfatoria	25
3.5 Las corrientes de Ca ²⁺ activadas por voltaje	30
3.6 Las neuronas olfatorias y sus precursoras como un modelo para el estudio del trastorno bipolar y de la esquizofrenia	34
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
5. HIPÓTESIS	37
6. OBJETIVO GENERAL	38
7. OBJETIVOS PARTICULARES	38
8. METODOLOGÍA	39
8.1 Obtención y cultivo de los precursores neuronales del epitelio olfatorio	39
8.2 Obtención de la fracción subcelular enriquecida con	

microtúbulos	40
8.3 Obtención de la fracción subcelular enriquecida con la proteína OMP	41
8.4 Determinación de la concentración de proteínas	42
8.5 Separación de las proteínas de las fracciones subcelulares	42
8.6 Detección de las proteínas con azul de Coomassie	43
8.7 Detección de las proteínas por Western blot	43
8.8 Inmunofluorescencia	44
8.9 Registro eléctrico de las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje	47
9. RESULTADOS	50
9.1 Sujetos donantes de las células del epitelio olfatorio	50
9.2 Caracterización de las células en el cultivo primario	51
9.3 Caracterización de la organización de los microtúbulos en los precursores neuronales del epitelio olfatorio	54
9.4 Caracterización de las neuronas olfatorias en el cultivo primario	63
9.5 Registro de las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje en neuronas olfatorias	67
9.6 Marcaje de los canales de Ca^{2+} tipos L y N en las células del cultivo primario	73
10. DISCUSIÓN	78
10.1 Caracterización del linaje de las células del cultivo	

primario	78
10.2 Caracterización de la organización del citoesqueleto en los precursores neuronales olfatorios	80
10.3 Caracterización de la corriente de Ca ²⁺ dependiente de voltaje tipo L en neuronas olfatorias	82
10.4 La organización del citoesqueleto y la corriente tipo L como biomarcadores de diagnóstico del trastorno bipolar y la esquizofrenia	87
11. CONCLUSIONES	88
12. PERSPECTIVAS	89
13. LITERATURA CITADA	90

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema del mecanismo neurobiológico implicado en la olfacción.

Figura 2. Células en cultivo obtenidas del epitelio olfatorio de humano.

Figura 3. Determinación de la especificidad del anticuerpo primario que reconoce a la isoforma neuronal de la tubulina β .

Figura 4. Caracterización de la estirpe de las células del cultivo primario del epitelio olfatorio.

Figura 5. Caracterización de los cultivos primarios obtenidos por exfoliación de la cavidad nasal de sujetos sanos y de pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia.

Figura 6. Estructura de los microtúbulos en los precursores neuronales del epitelio olfatorio obtenidos de los sujetos sanos y de los pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia.

Figura 7. Inmunodetección de las proteínas gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y actina en los precursores neuronales del epitelio olfatorio de humano.

Figura 8. Caracterización de la anhidrasa carbónica como un control de carga externo.

Figura 9. Detección de la anhidrasa carbónica agregada en los viales con las fracciones citoesqueleto-membranal y citosólica.

Figura 10. Organización de los microtúbulos en los precursores neuronales del epitelio olfatorio obtenidos de sujetos sanos y pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia.

Figura 11. Caracterización del anticuerpo primario que reconoce a la proteína OMP.

Figura 12. Identificación de las neuronas olfatorias en el cultivo primario del epitelio olfatorio obtenido de sujetos sanos y pacientes con trastorno bipolar o esquizofrenia.

Figura 13. Caracterización del registro de las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje en neuronas olfatorias obtenidas de un sujeto sano.

Figura 14. Corriente de Ca^{2+} dependiente de voltaje registrada en neuronas olfatorias obtenidas de sujetos sanos y pacientes con trastorno bipolar o esquizofrenia, en distintos pasajes de cultivo.

Figura 15. Registro de las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje en neuronas olfatorias de sujetos sanos y pacientes con trastorno bipolar o esquizofrenia.

Figura 16. Registro de la corriente de Ca^{2+} tipo L en neuronas olfatorias de sujetos sanos y pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia.

Figura 17. Corriente de Ca^{2+} activada por voltaje tipo L en neuronas olfatorias de pacientes con trastorno bipolar o esquizofrenia de género masculino o femenino.

Figura 18. Inmunodetección de los canales tipo L en células del epitelio olfatorio obtenidas de los sujetos sanos y de los pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia.

Figura 19. Inmunodetección de los canales tipo N en células del epitelio olfatorio obtenidas de los sujetos sanos y de los pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia.

Figura 20. Inmunodetección de los canales de Ca^{2+} tipo L en las neuronas olfatorias del cultivo primario.

Figura 21. Detección de los canales tipos L y N en el cultivo primario.

Tabla 1. Datos sociodemográficos de los donadores de las células del epitelio olfatorio.

1. RESUMEN

En los pacientes diagnosticados con trastorno bipolar (TB) o con esquizofrenia (EZ) se ha observado un volumen de tejido menor en el hipocampo, la amígdala, la corteza prefrontal, los bulbos olfatorios, entre otras regiones. Además, en estos pacientes se ha encontrado una disminución en la complejidad de las arborizaciones dendríticas, en el número de las espinas dendríticas y de los contactos sinápticos, así como en el diámetro de los tractos nerviosos. Lo anterior se ha asociado con una menor cantidad de proteínas asociadas al citoesqueleto (MAPs), cuya función es de estabilizar y promover el alargamiento de los microtúbulos. Evidencia obtenida *postmortem* indica que la disminución de las MAPs se asocia con la desorganización de los microtúbulos y la pérdida de dendritas, lo que a su vez puede reducir el volumen de las estructuras cerebrales mencionadas. Los microtúbulos, además de conferirle estructura a las proyecciones neuronales, modulan la funcionalidad de distintos tipos de corrientes iónicas, incluidas las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje. En este sentido, en los pacientes con TB o EZ se ha observado una reducción en su capacidad para percibir sustancias odoríferas. Recientemente se implementó un método para aislar y cultivar células precursoras de estirpe neuronal del epitelio olfatorio, parte de las cuales maduran espontáneamente en neuronas olfatorias. En este trabajo se caracterizó la organización de los microtúbulos y la funcionalidad de la corriente de Ca^{2+} tipo L en células de estirpe neuronal en cultivo, obtenidas por exfoliación de la cavidad nasal de pacientes con TB tipo I o con EZ paranoide. Para caracterizar la organización de los microtúbulos de los precursores neuroepiteliales, esta estructura del citoesqueleto se tiñó con un anticuerpo que reconoce a la tubulina β III mediante la técnica de inmunofluorescencia. Además, la tubulina ensamblada en los microtúbulos se separó de la tubulina globular mediante

centrifugación diferencial y se cuantificó por densitometría después de detectarla por Western blot y ECL. Las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje (CCAV) se estudiaron en las neuronas olfatorias diferenciadas espontáneamente en el cultivo, mediante la técnica de patch-clamp. La corriente tipo L se evaluó perfundiendo las neuronas con nifedipina. En las células precursoras de linaje neuronal obtenidas de sujetos sanos (SS), se observó que los microtúbulos se distribuyen en el citoplasma como una red homogénea que emerge desde un centro organizador, tal como ocurre típicamente en otras células. En cambio, en las células obtenidas de pacientes con TB o con EZ, se observaron microtúbulos cortos y áreas sin teñir. Al cuantificar el cociente área total citoplasmática/área sin teñir se observó que en los pacientes con EZ hubo una diferencia significativa en este cociente que fue 5 veces mayor respecto de los SS y dos veces mayor respecto de los pacientes con TB. No se observó diferencia al comparar la cantidad total de tubulina β III o las fracciones de tubulina polimerizada y globular entre los SS y los pacientes con EZ, aunque en los pacientes con TB se encontraron una menor cantidad total de tubulina β III y de la tubulina globular contenida en la fracción citosólica. Al cuantificar la CCAV tipo L, se encontró que ésta fue 50% menor en las neuronas olfatorias obtenidas de los pacientes con EZ respecto de la registrada en las neuronas de los SS y de los pacientes con TB. Los resultados obtenidos en este trabajo, apoyan la idea de que la organización de los microtúbulos y la CCAV tipo L tienen un alto potencial para ser considerados como biomarcadores de rasgo útiles en el diagnóstico del TB y de la EZ.

2. ABSTRACT

In schizophrenia (SZ) and bipolar disorder (BD), common structural alterations have been described in different brain regions including the hippocampus, prefrontal cortex, olfactory bulbs and amygdale, among other. Elsewhere, decrease in the complexity of dendritic arborizations, in the number of dendritic spines and in the number of synapses has been reported. Neuronal polarization into axonal and somatodendritic domains is determined by cytoskeletal structure and organization, which in turn depends on its interactions with Microtubule-associated proteins (MAPs). MAPs are high molecular-weight proteins that bind to microtubules and microfilaments, modulating their stability and polymerization. In addition, microtubule disruption causes a decrease in the functionality of ionic channels, such as those of L-type voltage-activated Ca^{2+} channels. In this regard, in TB and EZ patients have been reported a reduction in their odor detection threshold sensitivity. Diminished MAPs expression might lead to aberrant microtubular organization and which in turn may affect Ca^{2+} voltage-activated currents. Olfactory neuroepithelial cells in culture have been proposed as a model to study the physiopathology of psychiatric disorders and biomarker characterization for diagnosis. In this regard, we recently developed a non-invasive method to obtain viable olfactory neuroepithelial cells by nasal exfoliation from ambulatory patients and under culture conditions that promote neuronal progenitor-cell proliferation and their spontaneous morphofunctional polarization and differentiation into olfactory sensory neurons. The aim of this work was to characterize of microtubule organization as well as of the L-type Ca^{2+} current in cells of neuronal lineage obtained from nasal exfoliates of patients with paranoid type of SZ and BD type I. Microtubule organization was studied by immunofluorescence with a specific anti-III β -tubulin antibody and by quantification of

globular and assembled tubulin by Western blot. L-type Ca^{2+} current recording was performed by whole-cell patch-clamp technique and nifedipine superfusion. The results showed differential altered microtubular organization in neuronal precursors of SZ and BD. Short microtubules were observed in BD neuronal precursors, while extensive, unstained subcellular areas and disorganized microtubules were evident in SZ precursors. Patients with BD showed a decrease in amounts of tubulin in total homogenates and 40% decrease in the globular fraction. L-type Ca^{2+} current in olfactory neurons from BD was similar to that in healthy subjects. In contrast, this current in SZ was 50% lower than in the other groups. This reduction in L-type Ca^{2+} current in SZ together with differential microtubule alterations observed in DB and SZ are potential biomarkers that may differentiate these psychiatric disorders.

3. INTRODUCCION

A nivel mundial, los trastornos neuropsiquiátricos son un problema de salud pública. Incluso en el año 2001, la Organización Mundial de la Salud dedicó su reporte anual a la salud mental con el título: “Salud mental: Nuevos conocimientos, nuevas esperanzas” (OMS, 2001). En México, los trastornos mentales ocupan el quinto lugar entre los problemas de salud al medir la carga socio-económica que representan las enfermedades (Medina-Mora et al., 2003). La carga de la enfermedad es un indicador que se ha utilizado para evaluar el impacto de las enfermedades crónicas o de sintomatología de largo plazo, que incluye para su cuantificación el número de casos de muerte prematura y la cantidad de días vividos con discapacidad (Gómez et al, 2011). En este sentido, 4 enfermedades neuropsiquiátricas: la depresión mayor, el trastorno obsesivo compulsivo, la esquizofrenia y el alcoholismo, están entre las diez enfermedades más discapacitantes (OMS, 2001; Medina-Mora et al., 2003). Otro dato que nos permite dimensionar el problema que representan las enfermedades neuropsiquiátricas, es el resultado de la encuesta nacional de epidemiología psiquiátrica, en la que se encontró que uno de cada 5 mexicanos ha presentado un trastorno mental en algún momento de su vida (Medina-Mora et al., 2003).

El trastorno bipolar (TB) es uno de los trastornos afectivos con mayor prevalencia a nivel mundial, en México es del 1.3% de la población en edad productiva. Según el manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-IV, por sus siglas en inglés “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders”), este trastorno se caracteriza por la presencia alternada de episodios de manía y de episodios de depresión mayor. Se ha clasificado en dos subtipos, el trastorno bipolar tipo I que se

caracteriza por la presencia de al menos un episodio de manía o bien por la alternancia de un episodio de manía y de un episodio depresivo mayor. El otro subtipo es el trastorno bipolar tipo II, caracterizado por la presencia de al menos un evento depresivo mayor seguido de al menos un episodio de hipomanía (Asociación Americana de Psiquiatría, 2000).

La esquizofrenia (EZ) es un trastorno psiquiátrico caracterizado por la presencia de alteraciones del pensamiento, de las percepciones, las emociones, el movimiento y el comportamiento. Su prevalencia en México es de 0.7% y a nivel mundial de 1% en la población mayor a 17 años. Los signos y los síntomas observados en los pacientes con EZ son el delirio, las alucinaciones, el pensamiento desorganizado, el lenguaje desestructurado, alteraciones del comportamiento social, movimientos discordantes, dificultad para iniciar actividades con un propósito definido, el empobrecimiento del discurso y la creatividad así como el aplanamiento afectivo, entre otros. Se ha dividido en varios subtipos, entre ellos se incluye a la esquizofrenia paranoide, que se caracteriza por el predominio de ideas delirantes y de alucinaciones principalmente de tipo auditivo (Asociación Americana de Psiquiatría, 2000).

El desarrollo del TB o de la EZ se ha asociado con alteraciones anatómico-estructurales y funcionales en distintas regiones del sistema nervioso central (SNC), que se agudizan con el curso de la enfermedad en ausencia de un tratamiento adecuado (Brewer et al., 2003; Turetsky et al., 2003b; Takahashi et al., 2009; Wood et al., 2010). Además, en estos pacientes se ha detectado una disminución en su capacidad olfatoria (Turetsky et al, 2003a; Turetsky et al., 2009a), que ha sido

asociada con alteraciones en las estructuras del SNC que participan en la integración de la señal olfatoria, aunque al parecer el déficit observado en esta capacidad depende también de una disfunción en la transducción olfatoria que ocurre en las neuronas olfatorias de los pacientes (Arnold et al., 2001; Hahn et al., 2005; Sawa et al., 2009; Turetsky et al., 2009a; Turetsky et al., 2009c).

Un gran reto en el estudio de la fisiopatología del TB y de la EZ, ha sido la búsqueda de biomarcadores de rasgo en células periféricas que reflejen los cambios estructurales y moleculares de las neuronas del SNC (Heinze et al., 1990). Por ejemplo, en los linfocitos y las plaquetas obtenidos de los pacientes con EZ se han estudiado los receptores a dopamina, serotonina (Singh et al., 2003) y glutamato (Baier et al., 2009) así como los transportadores de serotonina (Govitrapong et al., 2002). Por su parte, en los pacientes con TB se ha estudiado la señal de Ca^{2+} en las plaquetas (Dubovsky et al., 1989 y 1991), los linfocitos (Hough et al., 1999) y los linfoblastos (Emamghoreishi et al., 1997).

Recientemente se ha propuesto que las células del epitelio olfatorio son un buen modelo para el estudio de la etiología del TB y de la EZ, ya que parte de las células que constituyen este epitelio son de estirpe neuronal y establecen conexiones sinápticas directamente con las neuronas del SNC (Roisen et al., 2001; Borgmann-Winter et al., 2009; Sawa et al., 2009; Turetsky et al., 2009b). Estas células neuronales, en cultivo, mantienen su funcionamiento y son susceptibles de proliferar para incrementar su número (Benitez-King et al., 2011). Otra razón que apoya su utilización en el estudio de las enfermedades psiquiátricas, es el hecho de que los pacientes con estos trastornos presentan una disminución en la percepción de los

olores así como anomalías funcionales en las células que conforman el epitelio olfatorio (Turetsky et al., 2009b).

3.1 Alteraciones anatómicas y estructurales en el sistema nervioso central en los pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia

Como se mencionó anteriormente, los pacientes diagnosticados con TB y con EZ presentan alteraciones en distintas regiones del SNC. En el hipocampo, la amígdala, la corteza prefrontal, los bulbos olfatorios, entre otras regiones, se ha observado una disminución en el volumen por medio de imágenes obtenidas con resonancia magnética cerebral (Gur et al., 1999; Gur et al., 2000; Baiano et al., 2008; Agarwal et al., 2008; Fornito et al., 2009; Ellison-Wright and Bullmore, 2010; Nguyen et al., 2010; Brambilla et al., 2013). Esta evidencia ha sugerido la presencia de anomalías en la densidad de las neuronas o en la complejidad de sus proyecciones (Zatorre et al., 2012).

La hipótesis de la presencia de disfunciones en la arquitectura neuronal se ha validado en estudios en los que se ha obtenido tejido cerebral *postmortem* de pacientes diagnosticados con estos trastornos. En este sentido, se ha encontrado una disminución en la complejidad de las arborizaciones dendríticas, en el número de espinas dendríticas y en el número de contactos sinápticos (Glantz and Lewis, 2000 y 2001; White et al., 2007; Kolomeets et al., 2007; Meyer and Feldon, 2010). Además, se ha observado una disminución en el diámetro de los tractos nerviosos, los cuales están constituidos por axones (Glantz and Lewis, 2000; Brambilla y Tansella, 2007; Ellison-Wright and Bullmore, 2010; Connor et al., 2011). El establecimiento de la arquitectura neuronal y el mantenimiento de la complejidad de

sus proyecciones dependen de la estructura y la dinámica del citoesqueleto (Daniels, 1975; Ledesma and Dotti, 2003; Halpain and Dehmelt, 2006; Montenegro-Venegas et al., 2010; Gonzalez-Billault, 2012; Vignaud, 2012). Esto sugiere que las alteraciones en la citoarquitectura neuronal y en las estructuras del SNC son causadas, entre otros factores, por un desarreglo del citoesqueleto (Benítez-King, 2006).

3.2 El citoesqueleto y las enfermedades psiquiátricas

El citoesqueleto es una estructura citosólica constituida por filamentos de tres tipos de biopolímeros proteicos: Los microfilamentos, los filamentos intermedios y los microtúbulos. El citoesqueleto determina el establecimiento y mantiene la morfología y la polarización celular, regula el transporte vesicular intracelular, constituye a los husos mitóticos que permiten el movimiento de los cromosomas durante la mitosis, posibilita la migración y la adherencia celular (Alberts et al., 2002) y además modula la funcionalidad de algunos tipos de proteínas integrales de membrana como los receptores heptahelicoidales acoplados a proteínas G o los canales iónicos (Johnson and Byerly, 1993; Pascarel et al., 1999; Malan et al., 2003), entre otras funciones.

Los microtúbulos están constituidos por las subunidades α y β de la tubulina, una proteína que se ha conservado con la evolución y que tiene un peso molecular de 50 kDa (Olmsted et al., 1970; Borisy et al., 1972; Alberts et al., 2002). La formación de los microtúbulos se lleva a cabo por medio de la polimerización de las subunidades de tubulina. Este proceso es dinámico, depende de la hidrolización de GTP (Borisy et al., 1972) e inicia con la conformación de protofilamentos que se ensamblan a

partir de un centro organizador o centrosoma (Borisy y Olmsted, 1972; Baas, P.W., Lin et al., 2011; Dráber et al., 2012; Subramanian y Kapoor, 2012). Cada protofilamento está constituido por heterodímeros de tubulina α y tubulina β (Alberts et al., 2002). Los protofilamentos se ensamblan longitudinalmente para alargar los microtúbulos e interactúan lateralmente para conformar la pared cilíndrica de estas estructuras del citoesqueleto (Subramanian y Kapoor, 2012).

En las células neuronales se expresa la isoforma III de la tubulina β , la cual se ha caracterizado como un marcador de estirpe neuronal (Berghuis et al., 2007; Attems et al., 2012; Theocharatos et al., 2013), debido a que únicamente estas células la expresan (Lee et al., 1990). Los protofilamentos se ensamblan espontáneamente para formar oligómeros cortos, aunque estos polímeros son inestables y se desensamblan continuamente (Kerssemakers et al., 2006; Margolin et al., 2012; Gardner et al., 2013). La velocidad de polimerización de los protofilamentos y el tamaño de los microtúbulos dependen, entre otros factores, de la concentración de las subunidades disponibles de la tubulina globular (Zhang et al., 2011; Margolin et al., 2012). Por lo anterior, la cuantificación de la fracción de tubulina despolimerizada se ha considerado como un indicador de la dinámica de los microtúbulos. La estabilidad de estas estructuras del citoesqueleto depende de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs, por sus siglas en inglés Microtubule-Associated Proteins) (Weingarten et al., 1975; Halpain y Dehmelt, 2006), aunque estas estructuras se polimerizan o despolimerizan continuamente manteniendo una estabilidad dinámica (Margolin et al., 2012; Gardner et al., 2013).

En estudios *postmortem* realizados en pacientes diagnosticados con EZ, se ha observado que está disminuida la cantidad de MAPs en el subiculum (Rosoklija et al., 2000), en la corteza entorrinal (Arnold et al., 1991), el hipocampo (Cotter et al., 1997), la corteza prefrontal (Jones et al., 2002) y los bulbos olfatorios (Rioux et al., 2004), lo que sugiere que los microtúbulos de las células neuronales en estos pacientes son inestables (Benítez-King et al., 2011). La disminución en las MAPs podría generar una pérdida de la polaridad y la complejidad neuronal y esto a su vez podría causar las alteraciones estructurales observadas en el SNC, así como alteraciones funcionales en la comunicación neuronal (Benitez-King, 2006).

Por su parte, los filamentos intermedios proporcionan la estabilidad en las células que son sometidas continuamente a un estrés mecánico (Alberts et al., 2002). En las neuronas maduras, estos filamentos están constituidos principalmente por neurofilaminas (Lee y Cleveland, 1996; Gotow, 2000; Liu et al., 2012), aunque en el epitelio olfatorio se ha observado que aún las células de estirpe neuronal tienen filamentos intermedios constituidos por vimentina (Schwob et al., 1986; Gorham et al., 1991; Aoki et al., 1995). La detección de esta proteína, junto con la detección de la tubulina β III, permite identificar a las células neuronales provenientes del epitelio olfatorio.

3.3 Alteraciones en la vía de integración de la información olfatoria en los pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia

Además de las alteraciones estructurales en el SNC, los pacientes diagnosticados con TB o con EZ presentan una disminución en la capacidad olfatoria que se agudiza con el curso de la enfermedad (Turetsky et al., 2003a; Turetsky et al.,

2009a). En estos pacientes, el umbral de detección de los olores aumenta, su capacidad para identificarlos disminuye y se modifica su capacidad para realizar tareas de memoria asociadas con los olores. Este déficit se asoció con la disminución en el volumen de las estructuras del SNC implicadas en la integración de la información olfatoria por lo que se sugirió que la deficiencia olfatoria era causada por las anomalías anatómico-estructurales del SNC (Turetsky et al., 1995; Turetsky et al., 2000; Shenton et al., 2001).

En los pacientes con EZ se ha detectado una disminución en el volumen de los bulbos olfatorios (Turetsky et al., 1995; Turetsky et al., 2000), correlacionada con alteraciones funcionales en la amplitud y la latencia de los potenciales evocados por estimulación olfatoria, registrados mediante electroencefalografía (Turetsky et al., 2003a). Además, estos dos parámetros se asociaron con un aumento en el umbral para percibir olores (Turetsky et al., 2003a). Se ha observado que los pacientes con EZ presentan también una disminución en el volumen de la corteza entorrinal, del hipocampo y de la amígdala, las cuales son regiones del SNC que participan en la integración de la información olfatoria y que están implicadas con la identificación de los olores, así como con otros parámetros de la capacidad olfatoria que están alterados en estos pacientes (Shenton et al., 2001). Estas evidencias en su conjunto permitieron sustentar la hipótesis de que el déficit olfatorio observado en los pacientes, depende de una alteración estructural y funcional del SNC.

Otro conjunto de evidencias ha permitido asociar la disminución de la percepción olfatoria con anomalías detectadas a nivel sensorial. En los pacientes con EZ se han caracterizado anomalías en la respuesta eléctrica de las neuronas olfatorias

estimuladas con sustancias odoras mediante el registro del olfatograma (Turetsky et al., 2009a). En estos experimentos, la aplicación de una sustancia odora a un paciente causa un incremento significativo en la amplitud del potencial de campo, lo que sugiere que el déficit en la percepción de los olores podría ser causado por un desacoplamiento en la transducción olfatoria ocurrida en las neuronas olfatorias de los pacientes (Turetsky et al., 2009a; Turetsky et al., 2009c). Además, en estudios *postmortem* en que se obtienen células del epitelio olfatorio de pacientes con EZ, se ha observado una disminución en la proporción de las células que maduran en neuronas olfatorias y también una alteración en la migración celular, proceso indispensable para que las neuronas olfatorias maduras se integren adecuadamente en el epitelio (Arnold et al., 2001). Por su parte, en los pacientes con TB se han obtenido neuronas olfatorias por biopsia de sujetos anestesiados y se han disociado para probar su capacidad de transducir señales odoras al estimularlas con mezclas de olores. Cuando las neuronas olfatorias de estos pacientes son estimuladas no se observa el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} que ocurre en las neuronas olfatorias obtenidas de sujetos sanos (Hahn et al., 2005). Estas evidencias sugieren, que en las neuronas olfatorias de los pacientes diagnosticados con TB o con EZ, ocurre un desacoplamiento en la transducción olfatoria que podría explicar, al menos en parte, el déficit en la percepción de los olores.

3.4 Mecanismo neurobiológico implicado en la transducción olfatoria

En los mamíferos, la percepción de las sustancias odoras inicia en las neuronas olfatorias localizadas en el epitelio olfatorio (Figura 1). Este epitelio cubre las paredes y el septum de la cavidad nasal, en las zonas turbinadas media y superior. Es de tipo pseudoestratificado columnar y está constituido principalmente por las

células sustentaculares de estirpe glial, por las neuronas olfatorias y por las células precursoras basales (Morrison y Costanzo, 1990; Leopold et al., 2000), las cuales son multipotenciales y permiten el recambio de las células gliales o neuronales del epitelio olfatorio aún en la etapa adulta (Krolewski et al., 2013; Rawson y Ozdener, 2013; Suzuki et al., 2013).

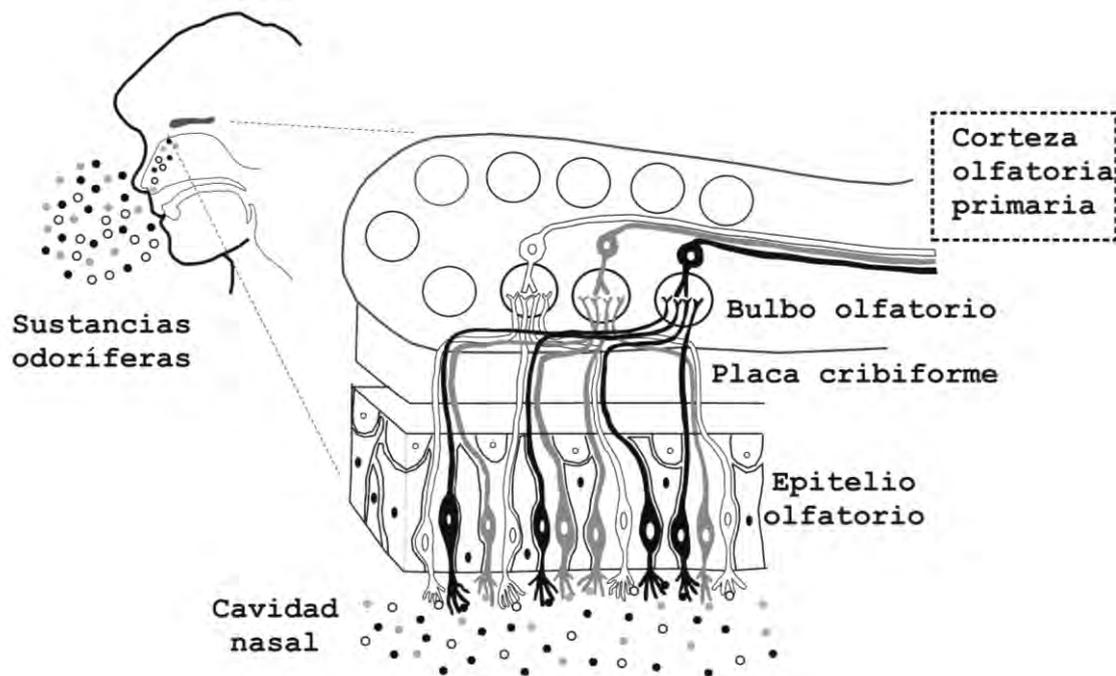


Figura 1. Esquema del mecanismo neurobiológico implicado en la olfacción. Las sustancias odoríferas presentes en el medio ambiente difunden en la mucosa nasal. Al llegar al epitelio olfatorio, se unen a los receptores de membrana específicos localizados en los cilios de las neuronas olfatorias. La información química se transduce en actividad eléctrica que a su vez se propaga por los axones de las neuronas olfatorias que cruzan por la placa cribiforme hacia las neuronas mitrales y en penacho de los glomérulos del bulbo olfatorio. Los axones de estas neuronas establecen contactos sinápticos con neuronas piramidales de la corteza olfatoria primaria.

Las neuronas olfatorias tienen una morfología bipolar, poseen una dendrita que termina en una protuberancia, a partir de la cual se proyectan de 10 a 25 cilios que están en contacto con el fluido nasal y poseen un axón que se proyecta hacia el bulbo olfatorio (Leopold et al., 2000). Las membranas citoplasmáticas de los cilios

tienen receptores heptahelicoidales acoplados a proteínas G (Mombaerts, 1999) a los cuales se unen las moléculas odoras (a la fecha se han secuenciado 350 genes que codifican a las proteínas receptoras de olores en el ser humano). Cada neurona olfatoria expresa un solo tipo de receptor odorífero y cada sustancia odora activa una variedad limitada de receptores (Schild y Restrepo, 1998). Las neuronas olfatorias que expresan el mismo tipo de receptor se distribuyen aleatoriamente en una de las cuatro zonas en las que se divide la superficie del epitelio olfatorio (Vassar et al., 1993).

Para que las sustancias odoras sean percibidas, la información química captada por los receptores a nivel de la membrana plasmática, es transformada en actividad eléctrica mediante la generación de un cambio en el potencial de la membrana conocido como potencial de receptor, el cual se propaga desde los cilios de las neuronas olfatorias hasta su axón (Schild y Restrepo, 1998). La fase de inicio o despolarizante del potencial de receptor se genera cuando las sustancias odoras se unen con su receptor de membrana específico, activando la subunidad alfa tipo $G_{\alpha\text{olf}}$ de la proteína G (Belluscio et al., 1998). Esta subunidad alfa se une y activa a su vez a la enzima adenilato ciclasa tipo III (ACIII) que incrementa la concentración intracelular de adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Este compuesto se une a los canales dependientes de nucleótidos cíclicos (llamados CNG por sus siglas en inglés, Cyclic Nucleotide-Gated) que permiten la entrada de Na^+ y Ca^{2+} a los cilios (Bönigk et al., 1999; Pifferi et al., 2006). Con el aumento intraciliar de Ca^{2+} , se activa la salida de iones de Cl^- a través de los canales tipo ANO2 (nombrados así por Anoctamina 2), con lo que se amplifica la despolarización de la membrana por la

disminución de las cargas negativas en el interior de los cilios (Stephana et al., 2009).

En los cilios, la fase de terminación del potencial de receptor o fase de repolarización depende del amortiguamiento del Ca^{2+} entrante. La concentración de este catión disminuye debido a que el AMPc sintetizado en respuesta a la estimulación olfatoria es hidrolizado por las enzimas fosfodiesterasas (PDE) PDE1C2 y PDE4A, reduciendo entonces el nivel de activación de los canales CNG (Cygnar y Zhao, 2009). Además, el Ca^{2+} entrante activa a la calmodulina (CaM) quien se une a los canales CNG disminuyendo sinérgicamente su permeabilidad (Bradley et al., 2009). El complejo Ca^{2+} -CaM se une también a las fosfodiesterasas para aumentar alostéricamente su actividad hidrolítica del AMPc (Cygnar y Zhao, 2009). Simultáneamente con lo anterior, el Ca^{2+} es transportado hacia el espacio extracelular a través del antiportador NCX1 (intercambiando Na^+ por Ca^{2+}) y una ATPasa membranal (Restrepo, 2005; Pyrski et al., 2007; Antolin et al., 2010; Castillo et al., 2010).

La propagación de la despolarización del potencial de receptor se lleva a cabo desde los cilios hacia la protuberancia, mediante la activación de los canales de Ca^{2+} tipo T y desde esta estructura se propaga hacia la dendrita y el soma hasta llegar al cono axonal de las neuronas olfatorias (Gautam et al., 2007). En la dendrita y el soma, la propagación y la amplificación de la despolarización del potencial de receptor ocurren por la entrada de Ca^{2+} a través de canales activados por voltaje, principalmente de los tipos L y N (Gomez et al., 2000; Shiraiwa et al., 2007). La fase de repolarización del potencial de receptor en estas estructuras, depende principalmente de la salida de K^+ a través de dos tipos de canales, unos activados

por voltaje de tipo rectificador tardío (Rawson et al., 1997) y otros activados por el Ca^{2+} entrante (Delgado et al., 2003).

Cuando el potencial de receptor alcanza el cono axonal de las neuronas olfatorias, se generan los potenciales de acción por la activación de los canales de Na^+ activados por voltaje (Schild y Restrepo, 1998). Los potenciales de acción se propagan a través del tracto olfatorio hacia los glomérulos de los bulbos olfatorios (Schild y Restrepo, 1998). La transducción de la señal química en eléctrica ocurrida en las neuronas olfatorias, es muy compleja y la integridad de los elementos moleculares para generar, propagar y modular los potenciales de receptor y de acción, repercuten directamente en la capacidad de los sujetos para percibir las sustancias odoras.

Las neuronas olfatorias que expresan el mismo tipo de receptor odorífero convergen en uno o dos glomérulos del bulbo olfatorio ipsilateral, conformando microcircuitos con las neuronas mitrales, las neuronas en penacho y con interneuronas periglomerulares (Figura 1) (Mori et al., 1999; Murphy et al., 2005). La aplicación de una sustancia odora, activa el conjunto de neuronas olfatorias que expresan el mismo tipo de receptor a olor y estas a su vez activan únicamente los glomérulos a los que proyectan sus axones. Este patrón espacial de activación conocido como mapa olfatorio, permite separar la información olfatoria de acuerdo con las características químicas de las moléculas reconocidas por cada tipo de receptor (Mori et al., 1999; Mombaerts et al., 1996). Las neuronas olfatorias son reemplazadas continuamente aún en la etapa adulta y para mantener la configuración del mapa olfatorio, el axón de la neurona reemplazante se extiende

hasta insertarse en el glomérulo que le corresponde en el mapa, según el tipo de receptor a olor que expresa (Mombaerts et al., 1996). La conformación y el arreglo continuo del mapa olfatorio repercuten en la capacidad de los individuos para percibir e identificar los olores. El mapa olfatorio se puede restablecer incluso después de una lesión severa del epitelio olfatorio, debido a que las células precursoras basales proliferan, se diferencian y maduran en células de estirpe glial y neuronal (Blanco-Hernández et al., 2012).

Los axones de las neuronas mitrales y en penacho se proyectan desde el bulbo olfatorio hasta las estructuras de la corteza olfatoria primaria, integrada por la corteza piriforme, parte de la amígdala y parte del giro parahipocampal anterior (Figura 1). De esta corteza, la información olfatoria se transmite hacia la corteza olfatoria secundaria, integrada por parte de la amígdala, la corteza entorrinal, el hipocampo y el tálamo. Como se mencionó, estas estructuras que presentan una disminución en su volumen en los pacientes con TB o con EZ, están involucradas en la identificación de los olores y en otros parámetros asociados con la capacidad olfatoria (Nguyen et al., 2010; Rupp, 2010).

3.5 Las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje

Los canales de Ca^{2+} activados por voltaje son proteínas integrales de la membrana que pertenecen a una superfamilia de genes que codifican a los canales iónicos activados por voltaje que incluye a los canales permeables a K^+ y Na^+ (Ertel et al., 2000). Estos canales tienen un poro selectivo y su activación está regulada por los cambios en el potencial que se genera a través de la membrana (Fatt y Katz, 1953; Hagiwara et al., 1975; Llinas y Yarom, 1981). Los canales de Ca^{2+} activados por

voltaje están clasificados en dos tipos considerando como criterios de identificación sus propiedades biofísicas: Los canales con alto umbral de activación (HVA por sus siglas en inglés, “High-Voltage-Activated”) y los canales con bajo umbral de activación (LVA por sus siglas en inglés, “Low-Voltage-Activated”). En el tipo HVA están incluidos los canales de los subtipos L, N, P/Q y R, que se han identificado por sus características biofísicas y principalmente por sus perfiles farmacológicos. Los canales del subtipo T son los únicos dentro de los LVA (Hofmann et al., 1994; Randall y Tsien, 1995; Nicholls et al., 2001).

La nomenclatura de las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje derivó principalmente de sus propiedades biofísicas y del tipo de células donde fueron caracterizadas. La corriente de los canales T es transitoria porque se inactiva rápidamente (T de “Transient”), a diferencia de la corriente de los canales L que regularmente es sostenida porque su nivel de inactivación es menor que en los otros subtipos (L de “Long-lasting”). La corriente N tiene una cinética intermedia entre la corriente T y la corriente L y se caracterizó en neuronas (N de “Neither T or L” o de “Neuron”). La corriente P/Q se caracterizó en células de Purkinje y las corrientes R son resistentes a los fármacos que bloquean el resto de las corrientes (R de “Resistent”). El estudio de los subtipos se ha facilitado con el uso de fármacos y toxinas que se unen selectivamente a los canales para bloquearlos. Las corrientes T se bloquean con kurtoxina y se inactivan con prepulsos despolarizantes; las corrientes L se bloquean principalmente con dihidropiridinas, las corrientes N con ω -conotoxina-GVIA y las corrientes P/Q con ω -agotoxina-IVA (Randall y Tsien, 1995; Wakamori et al., 1998).

La caracterización bioquímica de los canales ha permitido determinar que los HVA son complejos heterooligoméricos formados por varias subunidades proteicas, una subunidad α_1 , una subunidad β , una subunidad $\alpha_2\delta$ y en algunos casos una subunidad γ , manteniendo una estequiometría 1:1:1:1 (Dolphin, 2009). La subunidad α_1 es la responsable de las propiedades biofísicas de los canales y en los mamíferos se han secuenciado 10 genes que la codifican. Se han clonado cuatro isoformas de los canales tipo L, nombradas según Ertel et al. (2000) como $Ca_v1.1$ a 1.4, una isoforma de los P/Q llamada $Ca_v2.1$, una de los N ($Ca_v2.2$) y una de los R ($Ca_v2.3$). Además, se han clonado tres isoformas de los canales T, los $Ca_v3.1$ a 3.3. El resto de las subunidades son accesorias y modulan las propiedades de los canales (Dolphin, 2009). Los canales LVA aparentemente solo están formados por las subunidades α_1 .

El análisis de hidrofobicidad de las secuencias de las subunidades α_1 han permitido establecer que estas poseen cuatro dominios transmembranales homólogos (Dolphin, 2009). Cada uno está conformado por seis segmentos transmembranales de 20 residuos de aminoácidos nombrados S1 a S6, unidos por asas intra y extracelulares (Lacinová, 2005). Los segmentos S5 y S6 de los cuatro dominios forman el poro del canal y los segmentos S4 tienen de cuatro a seis residuos básicos de arginina y/o lisina que en un pH fisiológico se mantienen cargados positivamente por lo que este segmento puede actuar como un sensor de voltaje de la membrana (Beyl et al., 2012). La región del poro contiene un filtro de selectividad de los iones de Ca^{2+} (Kim et al., 1993; Kuo y Hess, 1993; Yang et al., 1993) aunque para estudiar las corrientes activadas por este catión, el Ca^{2+} se ha sustituido por iones divalentes como el Ba^{2+} (McNaughton y Randall, 1997; Wakamori et al., 1998).

La subunidad α_1 tiene además dominios de unión que le permite su interacción con las subunidades accesorias y otras proteínas moduladoras (Van Petegem et al., 2004; Dolphin, 2009).

Los canales del subtipo T, L y N son los que tienen una mayor participación en la amplificación de la señal de Ca^{2+} en las neuronas olfatorias (Shiraiwa et al., 2007). Los canales T están localizados principalmente en los cilios y posibilitan una despolarización transitoria para que el potencial de receptor se propague a la protuberancia de la dendrita (Gautam et al., 2007). Los canales L y N se localizan principalmente en la dendrita y el soma de las neuronas y posibilitan que el Ca^{2+} entre a estos compartimentos para amplificar el nivel de despolarización de la membrana durante la transducción olfatoria (Gautam et al., 2006). Además, el Ca^{2+} que entra a través de estos canales regula la apertura de canales permeables a K^+ que están implicados en el establecimiento de la tasa de disparo de las neuronas olfatorias y por lo tanto en la codificación de la señal odora que se propaga hacia los glomérulos de los bulbos olfatorios (Delgado et al., 2003; Kurt et al., 2012). La importancia de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje en la transducción olfatoria se determinó al reducir su función por la manipulación del gen que codifica la subunidad β que los conforma. En los ratones homocigóticos nulos, se observó un incremento en el umbral de percepción de las sustancias odoras y una disminución de la amplitud de la respuesta evocada por la estimulación olora en las neuronas olfatorias disociadas (Shiraiwa et al., 2007).

Además de las evidencias anteriores, en los pacientes con TB o con EZ se ha detectado una mutación en la subunidad alfa que constituye a los canales de Ca^{2+}

activados por voltaje tipo L (Bigos et al., 2010; Green et al., 2010; Liu et al., 2011), lo que sugiere que las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje y en particular la corriente tipo L de las neuronas olfatorias de sujetos con estas enfermedades neuropsiquiátricas, podría presentar alteraciones en su funcionalidad.

3.6 Las neuronas olfatorias y sus precursoras como un modelo para el estudio del trastorno bipolar y de la esquizofrenia

Como ya se mencionó, en el TB y la EZ se observa un déficit en la capacidad para percibir olores así como alteraciones en las células del epitelio olfatorio. Lo anterior ha sugerido que el estudio de este tejido pudiera evidenciar algunas de las causas que permitan explicar la deficiencia en la olfacción en estos pacientes, aunque también, dado que en el epitelio olfatorio hay células de estirpe neuronal que tienen conexión directa con las neuronas del bulbo olfatorio, este tejido también podría constituir un modelo que refleje los cambios moleculares presentes en las estructuras del SNC de los pacientes diagnosticados con estos trastornos neuropsiquiátricos.

El epitelio olfatorio humano se ha estudiado en cultivo a partir de células disociadas obtenidas *postmortem* o de sujetos vivos por biopsia bajo el efecto de anestésicos (Roisen et al., 2001; Jafek et al., 2002; Borgmann-Winter et al., 2009; Tajinda et al., 2010). Recientemente, se obtuvieron precursores neuronales a partir de un cultivo heterogéneo generado por el raspado de la cavidad nasal para exfoliar las células del epitelio olfatorio (Figura 2) (Benítez-King et al., 2011). Esta técnica implementada, a diferencia de la biopsia, no es invasiva ni requiere de la aplicación de anestésicos para la obtención de las células. Además, las condiciones en las que

las células del epitelio olfatorio son cultivadas después de ser obtenidas por exfoliación, propician que las precursoras neuronales se seleccionen y amplifiquen hasta alcanzar un número considerable, para abordar el estudio de la fisiopatología de los trastornos psiquiátricos incluso desde el ámbito de la proteómica y la biología molecular (Benítez-King et al., 2011).

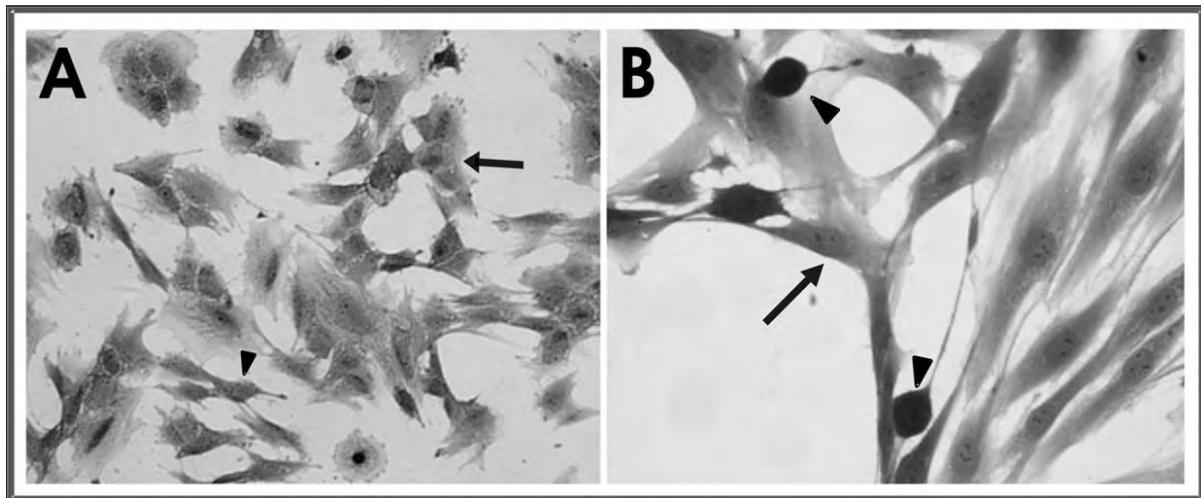


Figura 2. Células en cultivo obtenidas del epitelio olfatorio de humano. El Panel A (amplificación 200X) y el panel B (amplificación 400X) muestran células mitóticas señaladas con una flecha y células semejantes a neuronas sensoriales olfatorias señaladas con una punta de flecha.

En el cultivo de las células del epitelio olfatorio obtenidas por exfoliación de la cavidad nasal, se encuentra una población que expresa la proteína nestina, la cual forma los filamentos intermedios en las células progenitoras multipotenciales que a través de su amplificación transitoria posibilitan la presencia de células comprometidas para diferenciar y madurar en células de estirpe neuronal o de estirpe glial (Roisen et al., 2001; Jafek et al., 2002; Borgmann-Winter et al., 2009; Benítez-King et al., 2011).

En otros grupos de trabajo se ha podido establecer la presencia de neuronas olfatorias maduras en el cultivo de las células del epitelio olfatorio. Estas células neuronales se han identificado mediante la detección específica de la proteína OMP (Danciger et al., 1989), la cual se ha caracterizado como un marcador desde que fue descubierta por Margolis et al. (1982). Esta proteína tiene un peso molecular de 19 kDa y se distribuye en la dendrita, el soma y el axón de las neuronas olfatorias (Rogers et al., 1987; Krishna et al., 1995). Debido a que los axones de estas neuronas sensoriales hacen contacto sináptico con neuronas del bulbo olfatorio, la OMP se puede detectar también en los homogenados de este tejido (Kream y Margolis, 1984).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los pacientes diagnosticados con TB o con EZ presentan alteraciones estructurales en las neuronas del SNC. Además, estos pacientes tienen una disminución en la expresión de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs). Dado que las MAPs estabilizan a los microtúbulos y esta estructura del citoesqueleto participa a su vez en el mantenimiento de la arquitectura neuronal, en este proyecto estudiamos la organización de los microtúbulos en las células precursoras neuronales obtenidas mediante la exfoliación de la cavidad nasal de los pacientes con TB o con EZ.

Además, los pacientes diagnosticados con TB o con EZ presentan una alteración en la transducción olfatoria que está basada en la señal de Ca^{2+} . Dado que los canales de Ca^{2+} activados por voltaje permiten la amplificación de la señal generada por estimulación olfatoria en la dendrita y el soma de las neuronas olfatorias y dado que en estos pacientes se han detectado alteraciones genéticas en los canales de Ca^{2+}

activados por voltaje tipo L, en este proyecto estudiamos esta corriente de Ca^{2+} en neuronas olfatorias diferenciadas en el cultivo primario de los precursores neuronales, obtenidos del epitelio olfatorio de los pacientes con TB o con EZ.

Dado que las células obtenidas del epitelio olfatorio son de estirpe neuronal y se diferencian y maduran en neuronas olfatorias, estas células podrían ser un modelo experimental para probar las hipótesis de la presencia de alteraciones en el citoesqueleto y la funcionalidad de las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje, en particular la tipo L, en los pacientes diagnosticados con TB tipo I o con EZ tipo paranoide. La estrategia experimental que planteamos, nos permite abordar el estudio de la neurobiología del TB y la EZ mediante la evaluación del estado funcional de las células de estirpe neuronal en dos etapas de su desarrollo: como células precursoras de amplificación transitoria y como neuronas olfatorias maduras. El estudio nos permite también detectar marcadores biológicos que puedan ser utilizados en el diagnóstico clínico de estas enfermedades.

5. HIPOTESIS

Si los pacientes diagnosticados con trastorno bipolar o con esquizofrenia presentan una alteración en la arquitectura neuronal y una disminución en su capacidad olfatoria, entonces en las células neuroepileliales obtenidas de ellos, será deficiente la organización de los microtúbulos y habrá alteraciones en las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la funcionalidad de las células precursoras neuronales del epitelio olfatorio y de las neuronas olfatorias maduras en cultivo, obtenidas por exfoliación de la cavidad nasal de pacientes diagnosticados con trastorno bipolar tipo I o con esquizofrenia tipo paranoide.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterización de la estirpe de las células de los cultivos heterogéneos, obtenidas por raspado de la cavidad nasal de pacientes diagnosticados con TB o con EZ, mediante la detección de dos marcadores de linaje celular, la tubulina β III y la vimentina.

2. Caracterización de la organización de los microtúbulos en las células precursoras neuronales de los cultivos heterogéneos obtenidos por el raspado de la cavidad nasal de pacientes diagnosticados con trastorno bipolar o con esquizofrenia.

3. Identificar a las neuronas olfatorias maduras en los cultivos heterogéneos de las células del epitelio nasal obtenidas de pacientes diagnosticados con trastorno bipolar o esquizofrenia, mediante la detección de la proteína OMP.

4. Caracterizar las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje mediante registros de patch-clamp, en neuronas olfatorias diferenciadas espontáneamente en los cultivos obtenidos de los pacientes diagnosticados con trastorno bipolar o con esquizofrenia.

8. METODOLOGÍA

8.1 Obtención y cultivo de los precursores neuronales del epitelio olfatorio

Los cultivos del epitelio olfatorio se obtuvieron del banco de células criopreservadas, del Departamento de Neurofarmacología del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”. Los bancos se generaron con las células disociadas del tejido nasal, obtenidas por exfoliación de la cavidad nasal como se ha descrito detalladamente por Benítez-King et al. (2011).

La exfoliación de las células se realizó raspando con un cepillo la zona turbinada media anterior y el septum de 9 sujetos sanos (SS) y de 9 pacientes con diagnóstico de trastorno bipolar (TB) tipo I o de esquizofrenia (EZ) tipo paranoide. Para cultivar las células exfoliadas, el cepillo se sumergió en medio DMEM (por sus siglas en inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina y 1% de una solución de estreptomina con penicilina. Las células se desprendieron del cepillo por agitación mecánica y se disociaron haciéndolas pasar varias veces a través de la punta de una micropipeta. Posteriormente, las células se sembraron y se cultivaron en monocapa con medio DMEM suplementado de la manera mencionada, en una incubadora con inyección de aire para regular la temperatura en 37°C y el CO₂ en 5%.

Para criopreservar las células obtenidas del epitelio nasal, cuando éstas alcanzaron la confluencia se levantaron del sustrato incubándolas durante 3 a 5 min a 37°C con una solución de tripsina (0.03%) y EDTA (0.25%) disueltos en PBS (en mM): 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na₂HPO₄ y 2 KH₂PO₄ ajustada a un pH de 7.3. Las células suspendidas se sedimentaron por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. El medio

de cultivo se retiró para ser sustituido por un medio de criopreservación que contenía: medio DMEM, 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 1% de una solución de estreptomicina con penicilina y 8% de DMSO. Las células resuspendidas fueron colocadas en viales de criopreservación en una densidad de 1×10^6 células/mL. Los viales se mantuvieron durante dos horas a 4°C y luego se congelaron gradualmente primero a -20°C durante dos horas, luego a -70°C durante dos días para finalmente almacenarlos en tanques de nitrógeno en fase líquida.

8.2 Obtención de la fracción subcelular enriquecida con microtúbulos

Las células precursoras neuronales almacenadas en el banco se descongelaron en pasaje 4 y se cultivaron con medio DMEM suplementado como se describió previamente a 37°C y 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron la confluencia se desprendieron del sustrato y se sembraron en botellas de 25 cm² con una densidad de 20000 células/cm². Las células se cultivaron hasta alcanzar el 80% de confluencia.

Los cultivos de pasaje 5 con una confluencia del 80% se lavaron dos veces con una solución estabilizadora del citoesqueleto (SECSK) para evitar la despolimerización de los microtúbulos. La SECSK contenía (en mM): 20 PIPES, 4 EGTA, 200 KCl, 2 MgCl₂, 40% glicerol, ajustado el pH a 6.9 con NaOH; inhibidores de proteasas: ortovanadato de sodio 0.5 mM, pirofosfato de sodio 5 mM, 20 µg/ml de aprotinina, pepstatina y de leupeptina y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMFS) 0.5 mM. Esta solución se retiró por succión y se agregaron 350 µL de la solución SECSK con 0.1% de tritón durante 1 minuto a temperatura ambiente y posteriormente las botellas se rasparon con un gendarme para desprender las células adheridas al sustrato. La

fracción citoesqueleto-membranal (CSK-M) se separó de la fracción citosólica siguiendo el protocolo descrito por Gillespie et al. (1989). Las células se lisaron con dos pulsos de sonicación (40 Hz, 30 s) y luego se centrifugaron 2 veces a 13400 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Las pastillas que contenían la fracción CSK-M, obtenidas en los dos pasos de centrifugación se resuspendieron en SECK con tritón, agregando el mismo volumen que había sido recuperado en el sobrenadante después de la primera centrifugación. Inmediatamente después, las muestras se almacenaron a -70°C hasta que fueron procesadas por Western blot. También se obtuvo la fracción CSK-M del epitelio olfatorio, los bulbos olfatorios, el hipocampo y el hígado de ratas Wistar. Estos órganos se lavaron y homogenaron con la solución SECSK como se describió anteriormente. Las muestras obtenidas se almacenaron a -70°C.

8.3 Obtención de la fracción subcelular enriquecida con la proteína OMP

Cuando el cultivo en pasaje 5 alcanzó el 80% de confluencia, las células se lavaron dos veces con PBS y luego se incubaron durante 1 minuto utilizando una solución RIPA que contenía (en mM): 50 Tris pH 7.5, 0.5 EDTA, 1 EGTA, 5 DTT, 1 PMSF; 0.25% deoxicolato, 1% Nonidet P40, 1% Triton X-100; inhibidores de proteasas 20 µg/ml: aprotinina, leupeptina, pepstatina. Posteriormente la botella se raspó con un gendarme para obtener las fracciones de proteínas citoplasmáticas y membranales por centrifugación diferencial. Las células se lisaron con 2 pulsos de sonicación (40 Hz, 30 s) y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 105,000 g durante 1 hora 10 minutos a 4 °C para sedimentar las proteínas de la membrana. Las muestras de ambas fracciones se almacenaron a -70°C hasta que fueron procesadas por Western blot.

También se obtuvieron las fracciones de proteínas citoplasmáticas y membranales de tejidos de ratas Wistar: del epitelio olfatorio, el bulbo olfatorio, el corazón y el hígado. Para obtener las fracciones se siguió el método descrito anteriormente y las muestras se almacenaron a -70°C .

8.4 Determinación de la concentración total de proteínas

La concentración total de las proteínas contenidas en los homogenados de los cultivos de los precursores neuronales del epitelio olfatorio o en los tejidos obtenidos de ratas Wistar, se cuantificó siguiendo el método descrito por Lowry (1951). La curva de calibración se obtuvo con albumina de suero bovino variando su concentración de 5 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A los valores de absorbancia de los estándares de calibración obtenidos a una longitud de onda de 700 nm por espectrofotometría, se les aplicó una regresión lineal con el método de los cuadrados mínimos para ajustarlos a una función lineal. Para medir la concentración de las proteínas contenidas en las muestras se tomaron 10 μL para cuantificar su absorbancia por duplicado. La concentración total de proteínas se calculó mediante la ecuación de la recta.

8.5 Separación de las proteínas de las fracciones subcelulares

Las proteínas contenidas en las fracciones subcelulares, se separaron mediante la técnica de electroforesis unidimensional con el sistema SDS-Page de Laemmli (1970). Para separar la tubulina β III se utilizó geles de acrilamida al 10% y para separar la proteína OMP geles al 14%. Las proteínas se desnaturalizaron con calor y se utilizó β -mercaptoetanol para desestabilizar los puentes disulfuro.

8.6 Detección de las proteínas con azul de Coomassie

En algunos experimentos, las proteínas separadas en bandas por electroforesis se tiñeron con azul de Coomassie. Los geles se sumergieron en la solución del colorante durante 15 minutos y luego se lavaron con una solución que contenía metanol 50%, ácido acético 20% y 30% de agua desionizada. La solución de lavado se cambió cada 10 min. Los geles se deshidrataron manteniéndolos durante 2 h a una temperatura de 80°C y posteriormente se escanearon con un densitómetro. Las imágenes adquiridas se procesaron con el software ImagePro Plus (versión 6.3) y se cuantificó el área de las bandas de interés. La comparación estadística para determinar cambios en el área de las bandas se realizó con una prueba de ANOVA de una vía.

8.7 Detección de las proteínas por Western blot

Una vez separadas las proteínas por su peso molecular, se transfirieron del gel de acrilamida a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF por su nombre en inglés) mediante el sistema de transferencia húmeda. La detección de la tubulina β III transferida a las membranas se realizó con un anticuerpo primario monoclonal hecho en ratón (clon 2G10 Up State, Millipore) durante 2 horas. Posteriormente se añadió un anticuerpo secundario hecho en conejo acoplado a peroxidasa que reconoce inmunoglobulinas de ratón (Jackson) y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Para detectar la proteína OMP, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo primario policlonal hecho en cabra (W-17, Santa Cruz) durante 24 horas a 4°C. Posteriormente las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario hecho en conejo acoplado a peroxidasa que reconoce IgG's de cabra (Jackson) durante 2 horas a temperatura ambiente. La dilución óptima de

los anticuerpos primarios y secundarios se determinó aplicando concentraciones crecientes de las proteínas de la fracción citoesqueleto-membranal de las células del epitelio olfatorio humano para detectar la tubulina β III y de la fracción citoplasmática del epitelio olfatorio obtenido de ratas Wistar para detectar la proteína OMP.

La inmunodetección de las proteínas tubulina β III y OMP se realizó con la técnica de quimioluminiscencia (ECL por su nombre en inglés, “enhanced chemiluminiscence”) (Op De Beeck et al., 1997). Una vez incubadas las membranas con los anticuerpos, se incubaron con luminol (Santa Cruz) durante 1 minuto. Posteriormente, las membranas se expusieron a placas sensibles a rayos X (Kodak) y las membranas se detectaron por la reacción quimioluminiscente de la peroxidasa con el luminol. Las placas se escanearon con un densitómetro (G800, Bio-Rad) y se adquirieron imágenes con el software Quantity-One (Bio-Rad). En las imágenes se cuantificó la densidad óptica de cada banda de interés. Para encontrar el intervalo de variación lineal de la densidad óptica en las placas, se hizo una curva de calibración aplicando cantidades crecientes de la cantidad de proteína total cargada por carril y se calculó el coeficiente de correlación lineal. Cada muestra se procesó por cuadruplicado y se calculó la media \pm el error estándar de la densidad óptica. El peso molecular de las proteínas de interés se obtuvo midiendo la movilidad relativa (R_f) de los estándares de peso molecular conocido.

8.8 Inmunofluorescencia

Las células precursoras neuronales en pasaje 4 se cultivaron bajo las condiciones ya mencionadas en los apartados anteriores. Cuando alcanzaron la confluencia, se levantaron del sustrato con tripsina y EDTA disueltos en PBS y se contaron en un

hemocitómetro. Las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio de 3.6 cm² con una densidad de 10000 células/cm² y se cultivaron por cuatro días con medio DMEM suplementado con suero, L-glutamina y antibióticos.

En todos los experimentos, las células se fijaron después de cuatro días de cultivo. Las condiciones para fijar y permeabilizar las células dependieron de la proteína que sería teñida. Para detectar la tubulina β III o la proteína vimentina y utilizarlos como marcadores de linaje neuroepitelial, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% disuelto en una solución estabilizadora del citoesqueleto, que contenía (en mM): 137 NaCl, 5 KCl, 1.1 Na₂HPO₄, 0.4 KH₂HPO₄, 2 MgCl₂, 4 EGTA, 50 glucosa, 20 PIPES (el pH se ajustó a 6.9) y las células se permeabilizaron incubándolas con una solución de PBS y tritón al 0.1% durante 10 minutos. En los experimentos para detectar las neuronas olfatorias maduras utilizando como marcador a la proteína OMP o en los experimentos para teñir los canales permeables a Ca²⁺ tipos L o N, las células del cultivo se fijaron con paraformaldehído al 4% disuelto en PBS y las células se permeabilizaron incubándolas durante 10 minutos con una solución de PBS y Tween-20 al 0.1%. La unión inespecífica de cualquiera de los cuatro anticuerpos utilizados se bloqueó incubando las células durante 30 minutos con una solución de PBS con albúmina de suero bovino al 3%.

Posteriormente las células se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo anti-tubulina β III (clon 2G10 Up State, Millipore) se incubó a una concentración de 0.5 μ g/ml; el anticuerpo policlonal anti-vimentina (Zymed) a una dilución de 1:75; el anticuerpo anti-OMP (W-17, Santa Cruz) a una dilución de 1:100; el anticuerpo monoclonal contra la subunidad alfa 1 de los canales

tipo L (Abcam) a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ y el anticuerpo policlonal anti-canales tipo N (Abcam) a una concentración 1:600.

Los anticuerpos secundarios se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente: contra ratón hecho en cabra acoplado a fluoresceína (Molecular Probes), diluido 1:250; contra cabra hecho en burro acoplado a rodamina (Molecular Probes) con una dilución de 1:150; contra ratón hecho en cabra acoplado a rodamina (Jackson), diluido 1:300; contra conejo hecho en cabra acoplado a rodamina (Jackson) diluido 1:200. Los núcleos se tiñeron con 0.02 $\mu\text{g/ml}$ de 4,6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) durante 3 minutos. Los cubreobjetos se montaron con medio de montaje *Vectashield* y las preparaciones se mantuvieron en la oscuridad para evitar el apagamiento de la fluorescencia de los fluorocromos.

Para determinar la coexpresión de OMP y de los canales tipo L, o la coexpresión de los canales tipos L y N se realizaron experimentos de inmunofluorescencia de doble tinción simultánea. Las células se incubaron al mismo tiempo con los anticuerpos primarios anti-OMP y anti-Canales L o anti-canales L y anti canales N y posteriormente con los dos anticuerpos secundarios, siguiendo los procedimientos de fijación, permeabilización y bloqueo ya mencionados. Finalmente los núcleos se tiñeron con DAPI.

Las proteínas marcadas por inmufluorescencia se observaron mediante un microscopio de epifluorescencia (Nikon Ti-U) acoplado a una cámara (Nikon) y a una tarjeta analógica/digital para obtener imágenes con el software NIS-Elements (Nikon). En las imágenes adquiridas se determinó el número total de núcleos

marcados con DAPI para cuantificar el porcentaje de células positivas a cada uno de los anticuerpos, en 5 campos elegidos aleatoriamente.

En las células de SS y pacientes con TB o EZ en que los microtúbulos se estabilizaron y se tiñeron con el anticuerpo anti-tubulina β III, se midió el área total y el área sin teñir de 100 células por grupo elegidas al azar y se calculó el cociente área total/ área sin teñir. Se aplicó una prueba de ANOVA de una vía para detectar diferencias significativas entre los tres grupos.

8.9 Registro eléctrico de las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje

Las células en pasaje de cultivo 4 al 80% de confluencia, se levantaron del sustrato con tripsina y EDTA disueltos en PBS y se determinó la densidad de células en un hemocitómetro. Posteriormente, las células se sembraron en cubreobjetos previamente recubiertos con una solución de colágena de cola de rata, a una densidad de 10000 células/cm² y se mantuvieron en incubación durante tres días con medio de cultivo DMEM suplementado con suero, L-glutamina y antibióticos. Las células que se registraron al cuarto día, se identificaron por los rasgos morfológicos característicos de las neuronas olfatorias positivas al anticuerpo anti-OMP que fueron teñidas con la técnica de inmunofluorescencia.

Las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje se registraron en las neuronas olfatorias del cultivo del epitelio olfatorio, mediante la técnica de patch-clamp en la configuración de célula completa descrita por Hamill et al. (1981). El voltaje se fijó con un amplificador Axopatch 200A (Molecular Devices). Las señales eléctricas analógicas provenientes del amplificador se transformaron en señales digitales

mediante una tarjeta Digidata 1200 (Molecular Devices) para que pudieran ser procesadas posteriormente en una computadora con el software pClamp (versión 9.2, Molecular Devices). Los datos fueron filtrados a 5 kHz y digitalizados a 10 kHz.

Para realizar los registros se hicieron pipetas con punta de 5 a 10 M Ω y se llenaron con la siguiente solución (en mM): 130 CsCl, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, 3 ATP y 1 GTP, el pH ajustado a 7.3 con CsOH. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente al cuarto día de cultivo después de la siembra. Los cubreobjetos con las células neuronales se colocaron en la cámara de registro y se perfundieron con una solución Ringer que contenía (en mM): 145 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 Hepes y 1 Na piruvato, pH 7.3. Después de formar el gigasello y con el objetivo de estudiar de modo aislado las corrientes de Ca²⁺ activadas por voltaje, se cambió la solución Ringer por una solución de registro en la que el Ca²⁺ fue sustituido por Ba²⁺; esta solución contenía (en mM): 136 NaCl, 6 CsCl, 5 BaCl₂, 10 HEPES, 11 Glucosa, 10.1 ácido niflúmico, el pH ajustado a 7.4 con CsOH. Las corrientes de Ca²⁺ reguladas por voltaje se evocaron con pulsos despolarizantes desde -60 hasta +50 mV con pasos de 10 mV y con duración de 500 ms, iniciando en un potencial de fijación de -70 mV.

Para analizar la contribución de la corriente de Ca²⁺ tipo L a la corriente total de Ca²⁺, las células fueron perfundidas con una solución extracelular de registro que contenía 10 μ M de nifedipina para el bloqueo específico de los canales tipo L. Para determinar el tiempo adecuado de tratamiento de las células con nifedipina, se realizó un curso temporal registrando las corrientes 1, 3, 5, y 7 minutos después de iniciar la perfusión con la solución de bloqueo. Los cambios en la corriente de Ba²⁺

se determinaron en relación al pasaje de cultivo: se midió tanto la corriente total como la corriente bloqueada con nifedipina en neuronas olfatorias de los pasajes 1, 3 y 5.

La corriente evocada al fijar el voltaje de la membrana de las neuronas olfatorias se graficó en una curva de relación corriente-voltaje ($I-V$). La magnitud de la corriente en cada pulso comando se obtuvo calculando la corriente media de los valores obtenidos desde los 400 y hasta los 450 ms de cada pulso. Se determinó si ocurrían diferencias significativas en la corriente máxima o en la corriente remanente en presencia de nifedipina, aplicando una prueba de ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* de Tukey en los siguientes casos: 1) entre los tiempos en que fue medido el efecto de la nifedipina en el curso temporal, 2) entre los pasajes de cultivo y 3) comparando entre la corriente de las neuronas olfatorias en pasaje de cultivo 5 de los SS y los pacientes con TB o EZ.

9. RESULTADOS

9.1 Sujetos donantes de las células del epitelio olfatorio

Las células del epitelio olfatorio se obtuvieron de 9 SS sin antecedentes familiares de trastornos neuropsiquiátricos (4 mujeres y 5 hombres), de 9 sujetos con TB tipo I (4 mujeres y 5 hombres) y de 9 sujetos con EZ tipo paranoide (4 mujeres y 5 hombres). Los datos sociodemográficos de los donantes se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Datos sociodemográficos de los donadores de las células del epitelio olfatorio.

DIAGNOSTICO	AÑOS CON EL TRASTORNO	TRATAMIENTO	EDAD (años)	GÉNERO (MF)	HISTORIA FAMILIAR
EZ paranoide	23	AA	36	F	+
EZ paranoide	7	Naive	28	M	-
EZ paranoide	13	AT, AD, Biperideno	32	F	-
EZ paranoide	19	AA y AT	39	M	+
EZ paranoide	10	AT, AD, Akineton, Eutirox	33	F	+
EZ paranoide	11	AA	37	F	-
EZ paranoide	6	AA	31	M	-
EZ paranoide	4	AA, AD, Biperideno	27	F	-
EZ paranoide	11	AA, AD	37	M	+
TB Tipo I	10	AA, Li	28	F	-
TB Tipo I	8	Val	26	F	-
TB Tipo I	17	Li	33	F	+
TB Tipo I	23	Li, AA, AD, Lamotrigina	38	F	-
TB Tipo I	28	Val, AA	52	M	-
TB Tipo I	7	AD, Lomotrigina	24	M	-
TB Tipo I	9	Li	64	M	-
TB Tipo I	5	Valproato, Topiramato	24	F	-
TB Tipo I	30	Li, AA, ANS, Val	50	F	+
SS	--	ninguno	29	M	-
SS	--	ninguno	31	M	-
SS	--	ninguno	31	M	-
SS	--	insulina	43	F	-
SS	--	ninguno	36	F	-
SS	--	ANS	55	F	-
SS	--	levotiroxina	35	F	-
SS	--	ninguno	20	M	-
SS	--	ninguno	52	M	-

EZ= esquizofrenia, TB= trastorno bipolar, SS= sujeto sano; AA=Antipsicóticos atípicos, AT= Antipsicóticos típicos, AD= Antidepresivos, Li= litio, Val= Valproato, ANS= Ansiolíticos; M= masculino, F= femenino.

9.2 Caracterización de las células en el cultivo primario

Con el objetivo de determinar la estirpe de las células del cultivo primario obtenido por exfoliación de la cavidad nasal, se detectaron marcadores proteicos específicos de linaje. Uno de ellos fue la isoforma III de la tubulina β que es específico de la estirpe neuronal. El otro marcador fue la vimentina, una proteína expresada en las neuronas del epitelio olfatorio. Primero se determinó la especificidad del anticuerpo comercial que reconoce a la tubulina β III.

9.2.1 Caracterización de la especificidad del anticuerpo anti-tubulina β III

La especificidad del anticuerpo primario se probó en homogenados obtenidos de diferentes tejidos de ratas Wistar constituidos por células de distinto linaje y en homogenados de las células del epitelio nasal obtenidas de un sujeto sano y mantenidas en cultivo. En estos experimentos, el citoesqueleto se estabilizó para obtener las fracciones citoesqueleto-membranal (CSK-M) y citosólica (Cit) por centrifugación diferencial y la tubulina se inmunodetectó por Western blot.

La cantidad óptima de proteína total para la detección de la tubulina por Western blot, se determinó aplicando cantidades crecientes de proteínas totales y cuantificando en los fluorogramas la densidad óptica de las bandas detectadas con el anticuerpo primario. La densidad óptica tuvo un incremento proporcional a la cantidad de proteínas totales aplicadas entre 5 y 25 μg ($r^2 = 0.97$) (Figura 1A). La cantidad óptima de proteína total se determinó en 10 μg . Con el anticuerpo primario utilizado se marcó una banda con una movilidad relativa (R_f) de 0.52 que correspondió a un peso molecular de 50 kDa (Figura 1B). La densidad óptica de la banda detectada en los carriles de la fracción CSK-M fue similar a la detectada en la

fracción Cit, tanto en el hipocampo de las ratas Wistar (Figura 1C) como en los cultivos obtenidos del SS (Figura 1D). La isoforma III de la tubulina β sólo se detectó en los órganos de las ratas Wistar constituidos por células de estirpe neuronal (el hipocampo y el bulbo olfatorio) pero no en el hígado ni en el corazón (Figura 1C).

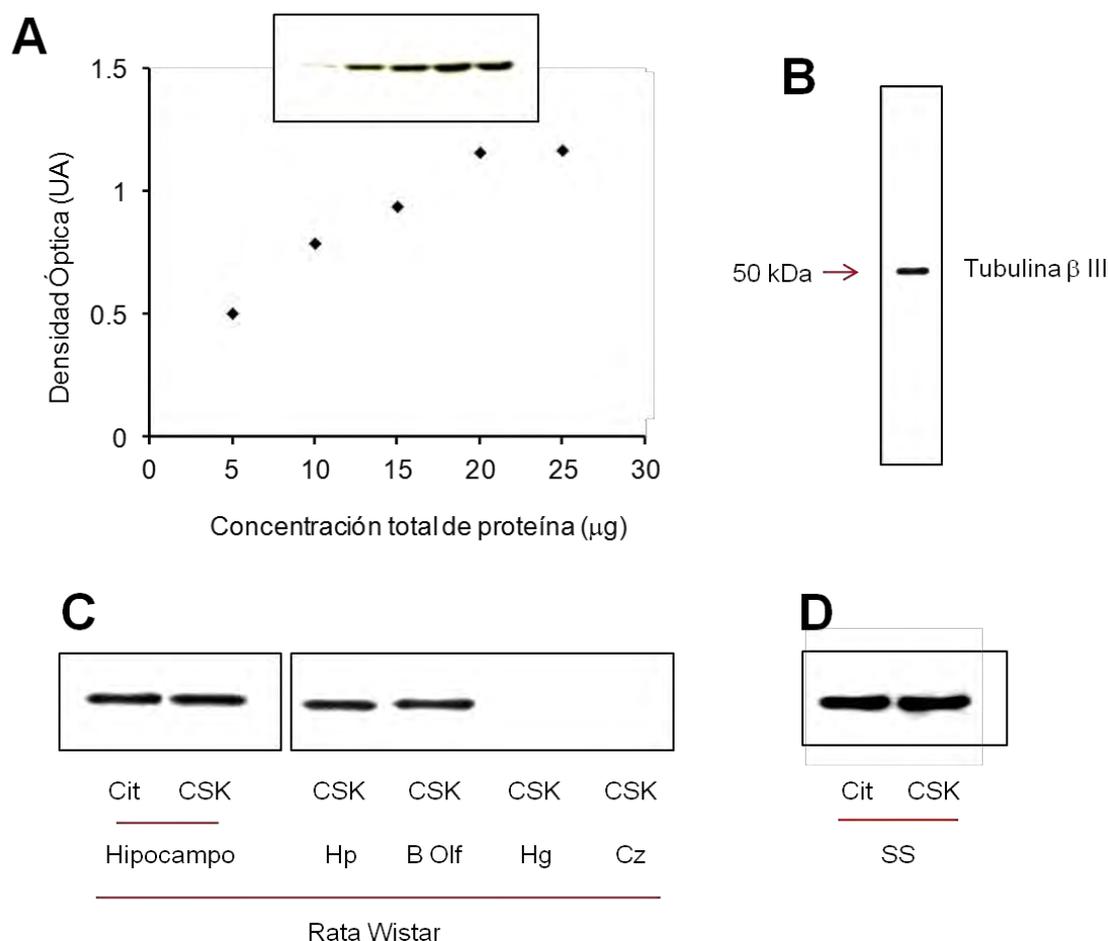


FIGURA 3. Determinación de la especificidad del anticuerpo primario que reconoce a la isoforma neuronal de la tubulina β . La especificidad del anticuerpo primario se caracterizó en tejidos obtenidos de ratas Wistar y en el cultivo de las precursoras neuronales obtenidas de un sujeto sano (SS). La tubulina β III se inmunodetectó con un anticuerpo monoclonal mediante Western blot. En el panel A se muestra la relación entre la cantidad creciente de proteína total del homogenado de las células del SS y la densidad óptica de las bandas detectadas con el anticuerpo anti-tubulina β III. En el panel B se muestra un experimento representativo de la movilidad relativa de la tubulina. En el panel C se observa la inmunodetección de la isoforma neuronal de la tubulina en las fracciones citoesqueleto-membranal (CSK) y citosólica (Cit), obtenidas por centrifugación diferencial de los tejidos de las ratas Wistar: el hipocampo (Hp), los bulbos olfatorios (B Olf), el hígado (Hg) y el corazón (Cz). En el panel D se muestra la detección de la tubulina neuronal en la fracción Cit o CSK de los precursores del SS. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado; Los resultados de A se representaron con el valor de la media ($n=4$).

9.2.2 Caracterización de las células del neuroepitelio olfatorio en el cultivo primario

Después de caracterizar la especificidad del anticuerpo anti-tubulina β III, se caracterizó la estirpe de las células del cultivo primario por inmunofluorescencia. En las preparaciones de las células del epitelio nasal en pasaje 5, obtenidas de un SS y observadas con un microscopio de epifluorescencia, se encontró que el 98% del total de las células teñidas con DAPI fueron positivas al anticuerpo anti-tubulina β III (Figura 2A). No se observaron células teñidas en el control negativo, lo que confirmó la especificidad del anticuerpo secundario (Figura 2B). Estos resultados sugieren que en el cultivo primario de las células obtenidas por exfoliación de la cavidad nasal y mantenidas en cultivo durante 5 días, predominan las células de estirpe neuronal.

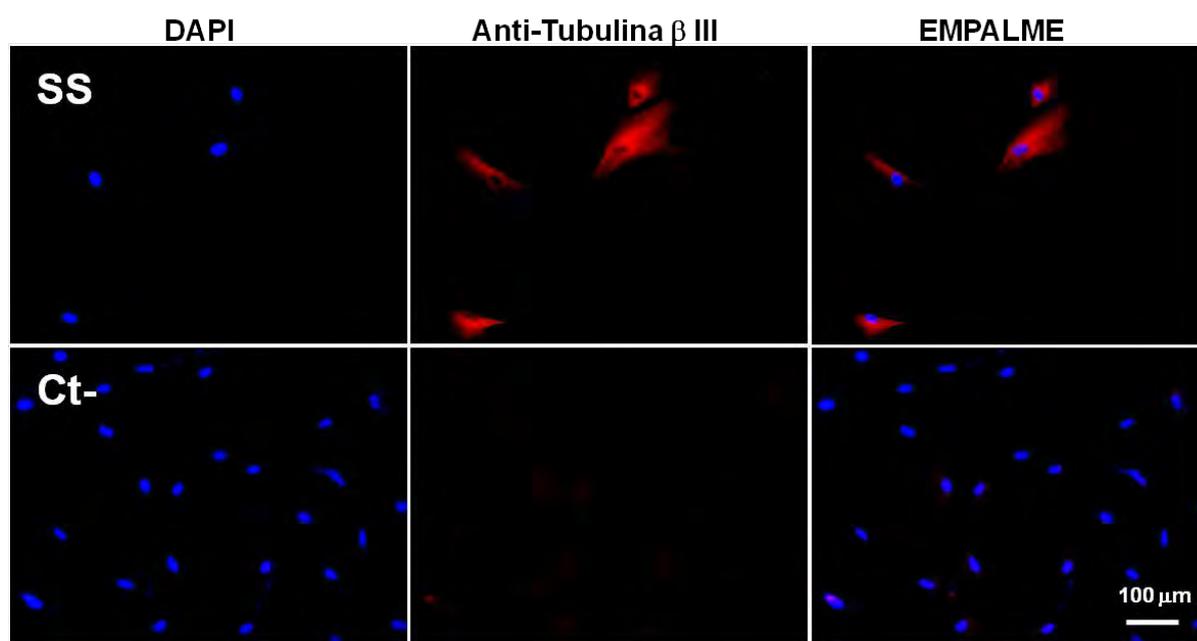


Figura 4. Caracterización de la estirpe de las células del cultivo primario del epitelio olfatorio. Las células se obtuvieron de un sujeto sano (SS) por exfoliación de la cavidad nasal. Las células en pasaje 5 se mantuvieron durante cuatro días en cultivo antes de fijarlas. El citoesqueleto se estabilizó para teñir los microtúbulos neuronales con el método de inmunofluorescencia (panel A) con un anticuerpo anti-tubulina β III y un anticuerpo secundario acoplado a rodamina (rojo). Los núcleos se teñieron con 4,6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) (azul). En el control negativo (Ct⁻) (Panel B) las células se incubaron con la solución de incubación sin el anticuerpo primario.

Para determinar si las células de los cultivos primarios obtenidos por raspado nasal de los SS y de los pacientes con TB o con EZ provienen del neuroepitelio olfatorio se utilizó un anticuerpo que reconoce a la vimentina. Esta proteína constituye los filamentos intermedios de las células neuronales del epitelio olfatorio en vez de las neurofilaminas. Las células obtenidas de los SS y de los pacientes con TB o con EZ se fijaron en pasaje 5 y se observó que el 100% del total de las células teñidas con DAPI también fueron positivas al anticuerpo anti-vimentina (Figura 3). Esto indicó que las células de estirpe neuronal del cultivo primario, obtenidas raspando la cavidad nasal provienen del epitelio olfatorio.

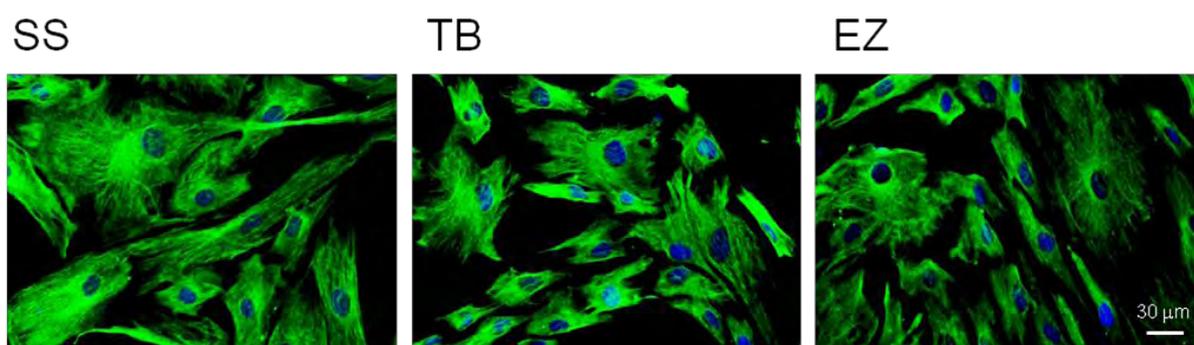


Figura 5. Caracterización de los cultivos primarios obtenidos por exfoliación de la cavidad nasal de sujetos sanos y de pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia. Las células se obtuvieron de los sujetos sanos (SS) y de los pacientes con trastorno bipolar (TB) o con esquizofrenia (EZ). Las células en pasaje 5 se mantuvieron durante cuatro días en cultivo antes de fijarlas. Los filamentos intermedios se tiñeron con un anticuerpo anti-vimentina y un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (verde) mediante la técnica de inmunofluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

9.3 Caracterización de la organización de los microtúbulos en los precursores neuronales del epitelio olfatorio

Con el objetivo de determinar la organización de los microtúbulos en las células precursoras del neuroepitelio olfatorio obtenidas de los SS y de los pacientes con TB o con EZ, se caracterizó la estructura de los microtúbulos y se determinaron las cantidades relativas de tubulina polimerizada y globular.

9.3.1 Caracterización de la estructura de los microtúbulos

La estructura de los microtúbulos neuronales se estudió en las células del epitelio olfatorio en el pasaje de cultivo 5. El citoesqueleto se estabilizó antes de iniciar el tratamiento para fijar y teñir las células. En las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia, se observó que los microtúbulos de las células precursoras de linaje neuronal obtenidas de los SS se distribuyen en el citoplasma como una red homogénea que emerge de un centro organizador, tal como ocurre típicamente en otras células. En cambio, en las células obtenidas de los pacientes con TB o con EZ se observaron microtúbulos cortos y áreas del citoplasma sin teñir (Figura 4A).

Con el objetivo de cuantificar esta diferencia observada en la estructura de los microtúbulos de los precursores obtenidos de los pacientes con TB o con EZ, se midió la superficie total de las áreas sin teñir para calcular el cociente del área total citoplasmática/área sin teñir. Al comparar el valor del cociente obtenido en las células de los SS con el obtenido en los pacientes con TB o con EZ se encontraron diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$). En los precursores neuronales obtenidos de los pacientes con EZ se encontró el doble de la superficie sin teñir respecto de las células obtenidas de los pacientes con TB y 5 veces más respecto del área sin teñir en las células obtenidas de los SS (Figura 4B). Estos resultados sugieren que en las células precursoras del neuroepitelio olfatorio obtenidas de los pacientes con TB o con EZ ocurre una anomalía en la estructura de los microtúbulos.

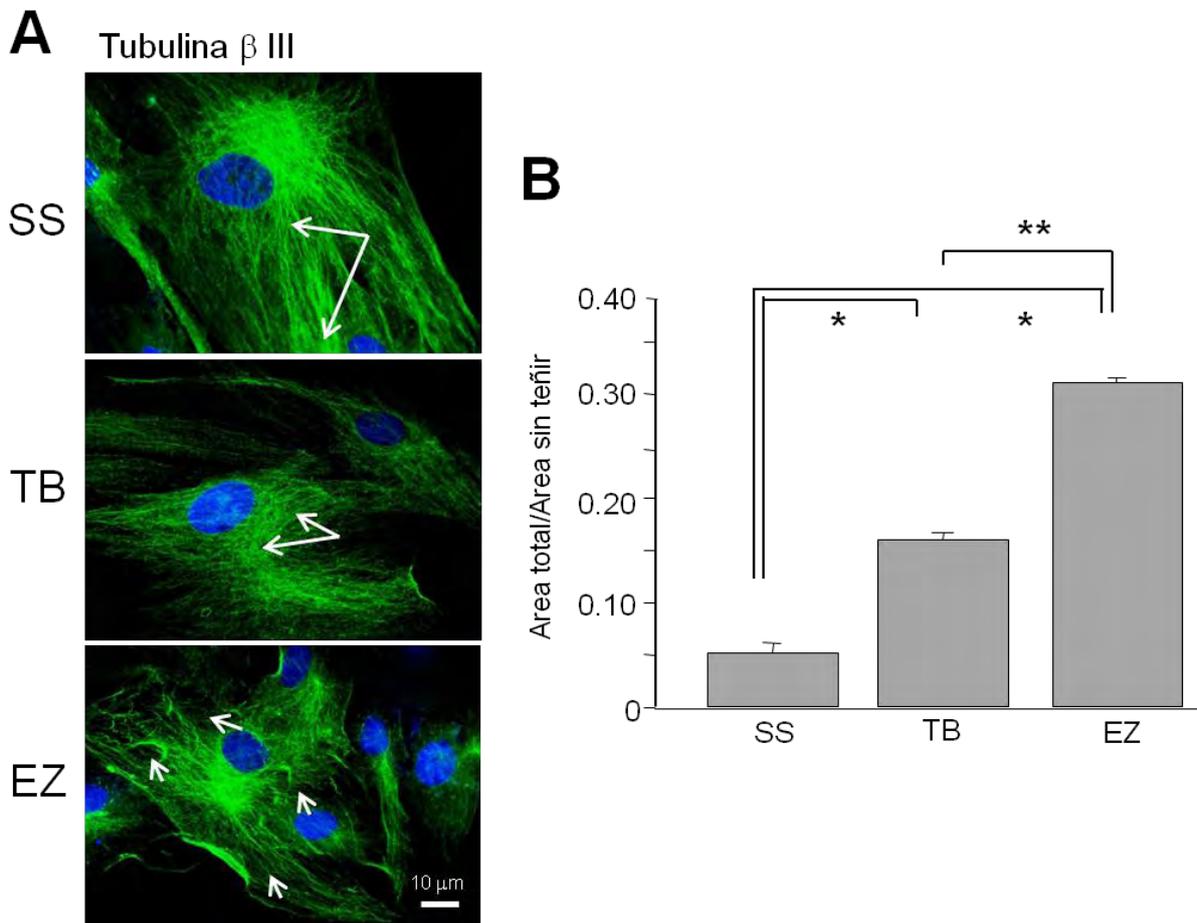


Figura 6. Estructura de los microtúbulos en los precursores neuronales del epitelio olfatorio obtenidos de los sujetos sanos y de los pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia. Las células del epitelio olfatorio se obtuvieron de los sujetos sanos (SS) y los pacientes diagnosticados con trastorno bipolar (TB) o con esquizofrenia (EZ). Las células en pasaje 5 se mantuvieron en cultivo durante cuatro días y los microtúbulos se tiñeron por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-tubulina β III y con un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). En el panel A se muestra una imagen representativa de las células obtenidas de un SS, de un paciente con TB y de un paciente con EZ. Las flechas en los paneles A-SS y A-TB indican la longitud de los microtúbulos y en el panel A-EZ indican las áreas sin teñir. En la gráfica del panel B se observa el cociente del área total citoplasmática/área sin teñir. Los resultados se representan con la media \pm el error estándar. Las determinaciones se realizaron en 100 células de cada uno de los cuatro sujetos por grupo.

9.3.2 Determinación de la cantidad total de tubulina y de las cantidades relativas de tubulina polimerizada y globular

La cantidad total de tubulina y las cantidades relativas de la tubulina polimerizada y globular, se determinaron mediante la inmunodetección de la isoforma neuronal de la tubulina β por Western blot y su cuantificación por densitometría. Para esto, las células del epitelio olfatorio obtenidas de los SS y de los pacientes diagnosticados con TB o con EZ se lisaron en pasaje 5 para obtener tanto los homogenados totales como las fracciones CSK-M y Cit separadas por centrifugación diferencial.

La proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó como control de carga en la cuantificación de la tubulina de los homogenados totales. La GAPDH no se utilizó como control en la cuantificación de la tubulina de las fracciones CSK y Cit porque se detectó únicamente en la fracción Cit (Figura 5 A). La actina, que también se ha utilizado convencionalmente como un control de carga, se distribuyó de modo diferencial en las dos fracciones obtenidas de las células precursoras de los pacientes con TB: la cantidad de actina detectada en la fracción CSK-M fue mayor que la detectada en la fracción Cit (Figura 5B). Estas diferencias en la inmunodetección de la GAPDH y de la actina, limitaron el uso de los controles de carga endógenos en la cuantificación de las cantidades relativas de la tubulina polimerizada y globular. Por lo anterior, para descartar un error experimental en la cantidad de proteínas totales aplicadas en los geles de acrilamida para separar la tubulina por electroforesis y detectarla por Western blot, se utilizó un control de carga externo.

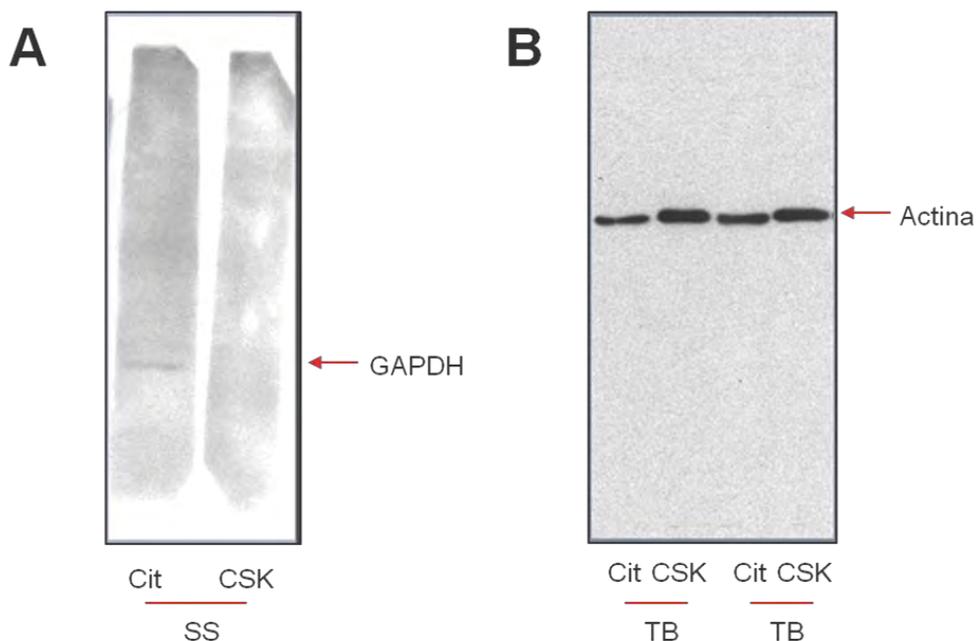


Figura 7. Inmunodetección de las proteínas gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y actina en los precursores neuronales del epitelio olfatorio de humano. Las células del epitelio olfatorio en pasaje 5, obtenidas de un sujeto sano (SS) y de dos pacientes diagnosticados con trastorno bipolar (TB) se cultivaron hasta que se alcanzó una confluencia del 80%. El citoesqueleto se estabilizó para obtener las fracciones citoesqueleto-membranal (CSK) y citosólica (Cit) por centrifugación diferencial. La proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y actina se detectaron mediante Western blot.

La anhidrasa carbónica purificada de bovino se utilizó como el control de carga externo para cuantificar las cantidades de tubulina polimerizada y globular (figura 6A). Primero se determinó la concentración óptima de la anhidrasa carbónica que se agregaría a los viales con las proteínas de las fracciones CSK y Cit previamente obtenidas de los homogenados de los SS y de los pacientes con TB o con EZ. Para esto se graficó el incremento de la concentración de la anhidrasa aplicada y el área de las bandas teñidas con azul de Coomassie. En la relación de estas variables se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.98, lo que indicó que el área teñida aumentaba proporcionalmente con la cantidad de anhidrasa que se aplicó en el intervalo entre 2 y 6 μg (Figura 6B). La cantidad óptima de esta proteína se determinó en 4 μg . En los geles teñidos con azul de Coomassie se detectó una sola

banda de 0.74 de movilidad relativa (Rf) que correspondió con un peso molecular de 32 kDa.

Posteriormente, en los viales con la fracción CSK-M o Cit se agregó la anhidrasa carbónica en una relación de 1:4 con las proteínas totales de cada vial. Las proteínas se separaron por electroforesis y los geles se tiñeron con azul de Coomassie (Figura 7A). En los geles se identificó la banda de la anhidrasa carbónica utilizando como criterio la movilidad relativa (Rf) de las proteínas. El área de las bandas de 32 kDa (indicadas con una flecha en la Figura 7A) de las fracciones CSK-M y Cit obtenidas de las células del epitelio olfatorio de los SS y de los pacientes con TB o con EZ, se comparó y no se encontraron diferencias significativas (ANOVA $p > 0.05$) (Figura 7B). Esto indicó que la cantidad de proteína total que se tomó de cada vial para cuantificar la tubulina de las fracciones CSK-M y Cit fue similar.

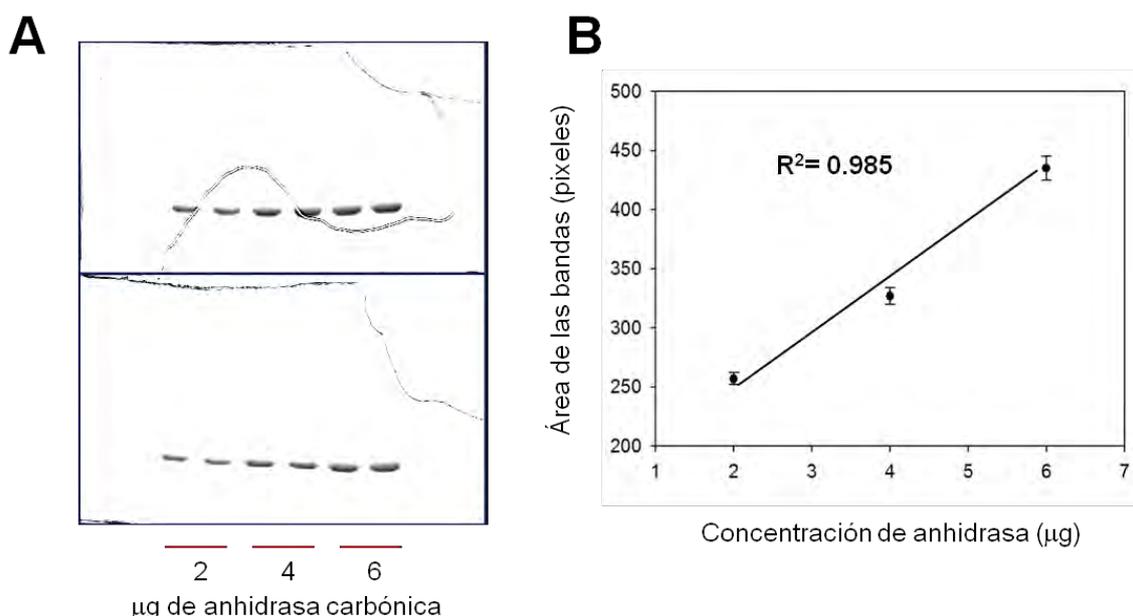


Figura 8. Caracterización de la anhidrasa carbónica como un control de carga externo. La anhidrasa carbónica comercial purificada de bovino se disolvió en una solución que contenía SDS y β -mercaptoetanol. La anhidrasa se movilizó en el gel de acrilamida mediante la técnica de electroforesis unidimensional y se tiñó con azul de Coomassie. Los geles se deshidrataron con calor y se obtuvieron las imágenes con un densitómetro (panel

A). En las imágenes obtenidas se determinó el área de las bandas de cada concentración de la anhidrasa mediante el software ImagePro y se graficó para calcular el coeficiente de correlación (panel B). En la gráfica se muestra el valor de la media \pm el error estándar (n=4).

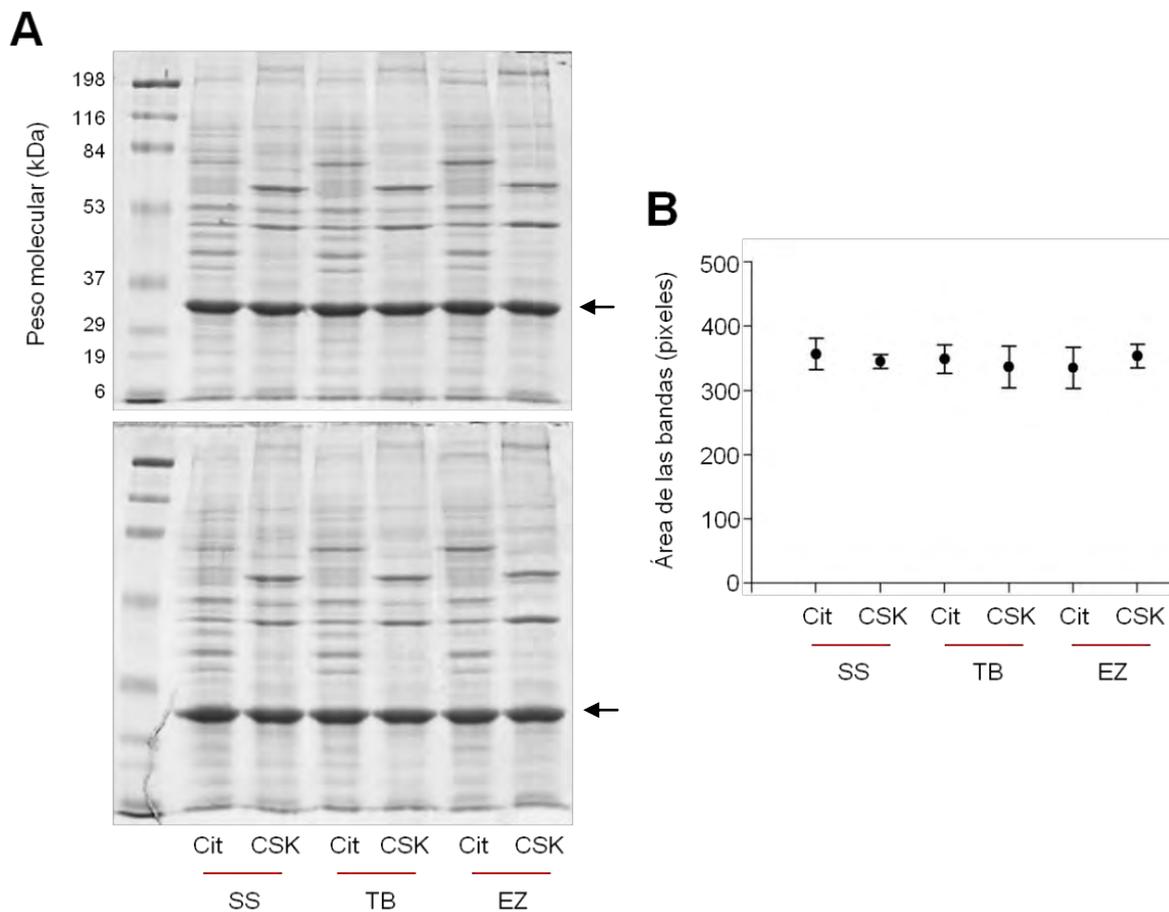


FIGURA 9. Detección de la anhidrasa carbónica agregada en los viales con las fracciones citoesqueleto-membranal y citosólica. Se cultivaron las células precursoras neuronales del epitelio olfatorio obtenidas de un sujeto sano (SS), de un paciente con trastorno bipolar (TB) y de un paciente con esquizofrenia (EZ). El citoesqueleto se estabilizó para obtener las fracciones citoesqueleto-membranal (CSK) y citosólica (Cit) por centrifugación diferencial. A los viales con las proteínas de cada fracción se les agregó la anhidrasa carbónica en una relación 4:10 con las proteínas totales. Las proteínas se separaron por electroforesis unidimensional y los geles teñidos con azul de Coomassie se deshidrataron para escanear las imágenes con un densitómetro (panel A); con las flechas se indica la banda que correspondió con la movilidad relativa de la anhidrasa. En las imágenes obtenidas se determinó el área de las bandas mediante el software ImagePro y se comparó con una prueba de ANOVA de una vía. En el panel B se muestra la gráfica del área de las bandas de la anhidrasa en las fracciones CSK-M y Cit de los SS y de los pacientes con TB o con EZ; se muestra el valor de la media \pm el error estándar (n=4).

Una vez que se caracterizó el control de carga externo, se midió la cantidad de tubulina β III en los homogenados totales o en las fracciones CSK-M y Cit de las células precursoras en pasaje 5 obtenidas de los SS y de los pacientes diagnosticados con TB o con EZ. En las células obtenidas de los pacientes con TB se encontró menor cantidad de tubulina en los homogenados totales. No se obtuvieron diferencias comparando la cantidad del control de carga (la GAPDH) entre los tres grupos (Figura 8A).

En la Figura 8B se observa un ejemplo representativo de un fluorograma en el que se detectó la tubulina en las fracciones CSK-M y Cit por Western blot. No se encontraron diferencias al comparar el área de las bandas de la anhidrasa carbónica en las fracciones CSK-M y Cit (Figura 8 C), lo que indicó que las diferencias en la cantidad de tubulina entre las fracciones subcelulares no fue dependiente de un error experimental (Figura 8C).

En el panel D se muestra la comparación de la cantidad de tubulina β III detectada en las fracciones CSK-M y Cit de los precursores neuronales. No se encontraron diferencias significativas comparando la tubulina contenida en las dos fracciones entre los SS y los pacientes con EZ (Figura 8C). En las células lisadas que se obtuvieron de los pacientes con TB se encontró una cantidad de tubulina en la fracción Cit 40% menor que en los SS y los pacientes con EZ (Figura 8C).

Estos resultados indican que en las células precursoras neuronales obtenidas de los pacientes con TB se presenta una disminución en las cantidades de tubulina total y de la tubulina en su forma globular. Los resultados sugieren también que la ausencia

de microtúbulos en las áreas sin teñir observadas por inmunofluorescencia, principalmente en las células de los pacientes con EZ, no depende de una disminución en la cantidad de tubulina polimerizada.

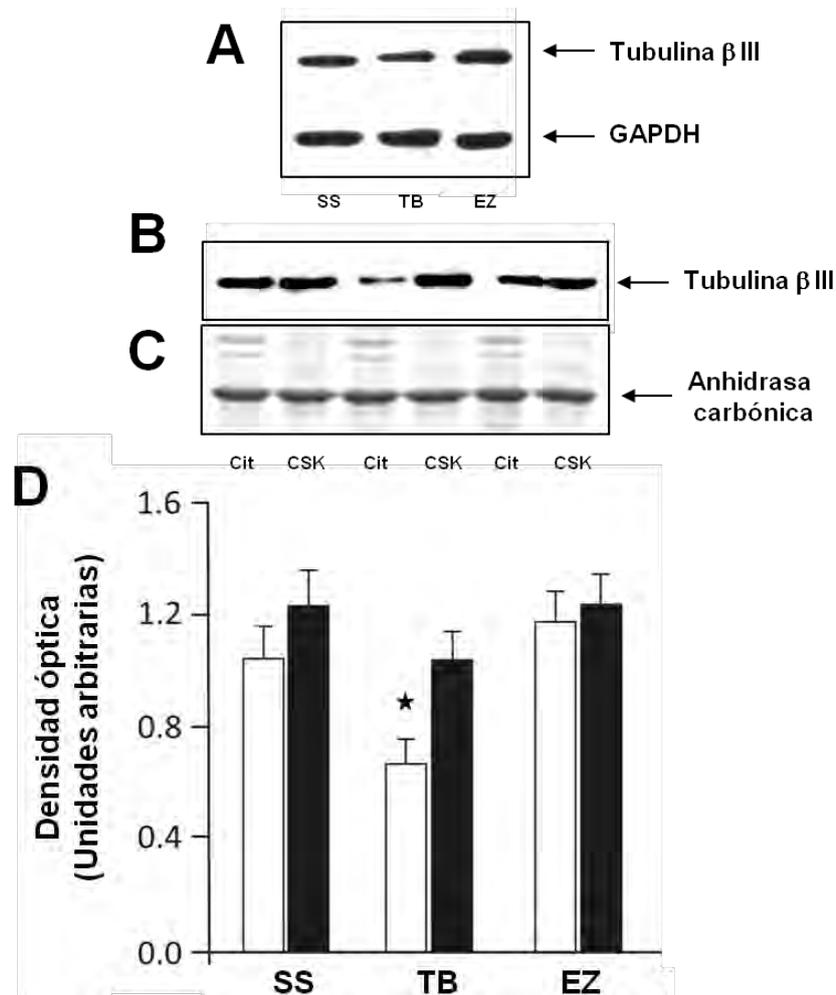


Figura 10. Organización de los microtúbulos en los precursores neuronales del epitelio olfatorio obtenidos de sujetos sanos y pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia. Se cultivaron las células precursoras del neuroepitelio olfatorio obtenidas de 4 sujetos sanos (SS) y de 8 pacientes con trastorno bipolar (TB) o con esquizofrenia (EZ). En el panel A se muestra la tubulina β III detectada en los homogenados totales de las precursoras; la proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó como control de carga. Para cuantificar las cantidades relativas de tubulina polimerizada y globular, el citoesqueleto se estabilizó para obtener las fracciones citoesqueleto-membranal (CSK) y citosólica (Cit) por centrifugación diferencial. En el panel B se muestra un fluorograma representativo de la detección de la tubulina neuronal en las fracciones CSK-M y Cit. En el panel C se muestra la tinción de las proteínas con azul de Coomassie después de aplicar la anhidrasa carbónica. En la gráfica del panel D se cuantificó por cuadruplicado la densidad óptica de la tubulina detectada en las fracciones Cit y CSK. El asterisco indica diferencia significativa aplicando una prueba de ANOVA de una vía ($p < 0.05$). Se muestra el valor de la media \pm el error estándar.

9.4 Caracterización de las neuronas olfatorias en el cultivo primario

Con el objetivo de identificar a las neuronas olfatorias en los cultivos primarios de las células precursoras del epitelio olfatorio, se detectó a la proteína “Olfactory Marker Protein” (OMP, por sus siglas en inglés). La OMP se expresa únicamente en las neuronas olfatorias maduras, por lo que se ha considerado como un marcador específico de este tipo neuronal. Antes de caracterizar a las neuronas olfatorias en el cultivo primario se corroboró la especificidad del anticuerpo comercial que reconoce a la OMP.

9.4.1 Caracterización de la especificidad del anticuerpo anti-OMP

La proteína OMP es citoplasmática y se distribuye en la dendrita, el soma y a todo lo largo del axón de las neuronas olfatorias. Para caracterizar la especificidad del anticuerpo que reconoce a la OMP, se obtuvo la fracción subcelular de las proteínas del citoplasma de los dos tejidos de las ratas Wistar que contienen a las estructuras mencionadas de las neuronas olfatorias: el epitelio olfatorio y los bulbos olfatorios y de dos tejidos que no las contienen: el hipocampo y el hígado. Además, se utilizó a las células precursoras neuronales del epitelio olfatorio obtenidas de un SS.

La cantidad óptima de proteína total para detectar a la OMP por Western blot se determinó mediante la aplicación de cantidades crecientes de proteínas totales y la cuantificación de la densidad óptica de las bandas detectadas en los fluorogramas con el anticuerpo anti-OMP. La densidad óptica tuvo una relación lineal con la cantidad de proteína total aplicada en el intervalo entre 10 y 25 μg ($r^2 = 0.99$) (Figura 9A). La cantidad óptima de proteína total se determinó en 15 μg . Con el anticuerpo comercial utilizado que reconoce a la OMP, se detectó una proteína de 19 kDa

(Figura 9B) en la fracción de las proteínas citoplasmáticas de las células del epitelio olfatorio y los bulbos olfatorios de las ratas Wistar (Figura 9C). La OMP no se detectó en las fracciones subcelulares obtenidas del hipocampo ni del hígado de las ratas (Figura 9C).

La especificidad del anticuerpo primario se determinó también utilizando el cultivo de los precursores neuronales del epitelio olfatorio de un SS. El anticuerpo primario se preadsorbió con un péptido de bloqueo y la banda de la OMP ya no fue detectada después del ensayo de preadsorción (Figura 9D). Estos resultados indican que el anticuerpo primario utilizado reconoce a las neuronas olfatorias y que este tipo neuronal está presente en los cultivos de las células precursoras neuronales del epitelio olfatorio obtenidos por el raspado de la cavidad nasal.

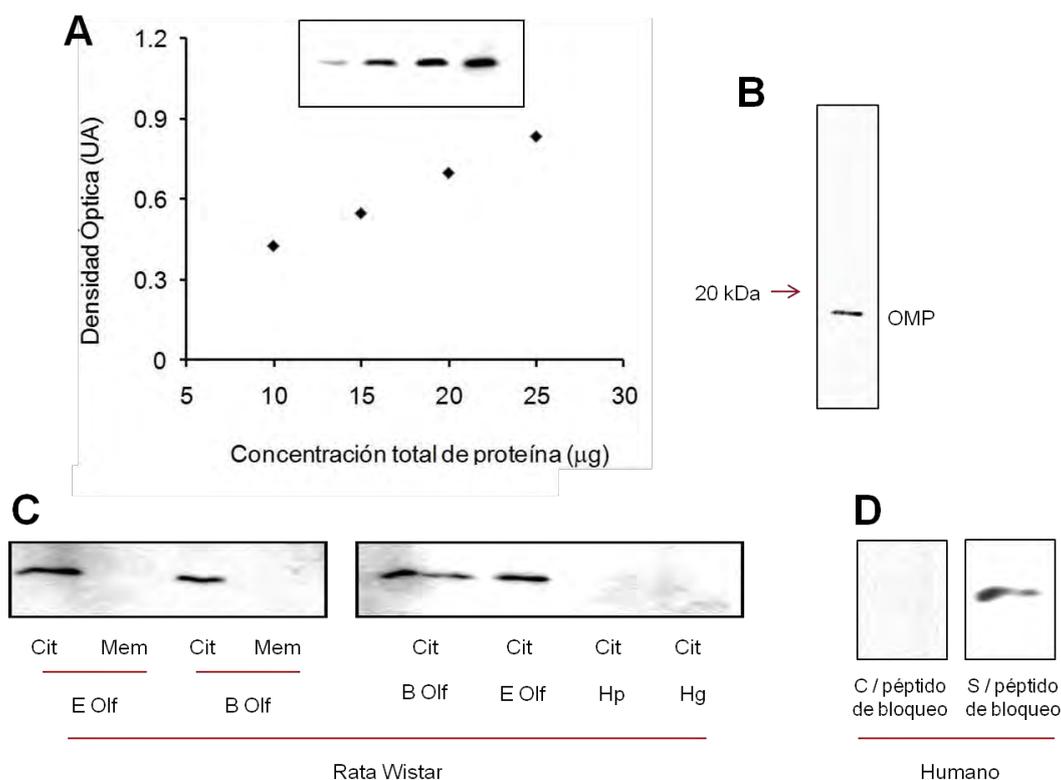


FIGURA 11. Caracterización del anticuerpo primario que reconoce a la proteína OMP. La especificidad del anticuerpo primario se determinó en homogenados de tejidos obtenidos de ratas Wistar y en el cultivo de las células obtenidas de un sujeto sano en pasaje 5. Los

tejidos o las células se lisaron por sonicación y se obtuvieron las fracciones de proteínas membranales (Mem) y citoplasmáticas (Cit) por centrifugación diferencial. La proteína OMP se detectó por ECL con un anticuerpo policlonal y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. En el panel A se muestra la relación entre las densidades ópticas obtenidas por densitometría y las cantidades crecientes de proteína total aplicadas al gel; se muestra el valor de la media (n=4). En el panel B se muestra la movilidad relativa de la proteína detectada con el anticuerpo anti-OMP. En el panel C se muestra la detección de la OMP en las fracciones Cit y Mem del epitelio olfatorio (E Olf), los bulbos olfatorios (B Olf), el hipocampo (Hp) y el hígado (Hg) obtenidos de las ratas Wistar. En el panel D se muestra un ensayo de preadsorción del anticuerpo primario anti-OMP con un péptido de bloqueo y la detección de esta proteína en los homogenados de las células del epitelio olfatorio del SS.

9.4.2 Identificación de las neuronas olfatorias en el cultivo primario

Después de caracterizar la especificidad del anticuerpo anti-OMP con los homogenados de los tejidos o del cultivo celular, las neuronas olfatorias maduras se identificaron en el cultivo primario de los precursores neuronales del epitelio olfatorio con la técnica de inmunofluorescencia.

Las células olfatorias en pasaje 5 obtenidas de los SS y de los pacientes diagnosticados con TB o con EZ, se mantuvieron en cultivo con medio DMEM suplementado con 10% de SFB durante 4 días. El 2% del total de las células del cultivo detectadas con DAPI fueron inmunopositivas al anticuerpo anti-OMP (Figura 10A-C). En los controles negativos no se observaron células teñidas (Figura 10D). Este resultado sugiere que en los cultivos de los precursores del epitelio olfatorio, una parte de las células se diferencian y maduran como neuronas olfatorias sin agregar al medio ningún factor trófico. Las células marcadas con el anticuerpo anti-OMP tenían una morfología diferenciable en el microscopio de luz, eran células bipolares con el soma redondo o elíptico. Estos criterios morfológicos se utilizaron para el registro de las corrientes iónicas de Ca^{2+} de las neuronas olfatorias.

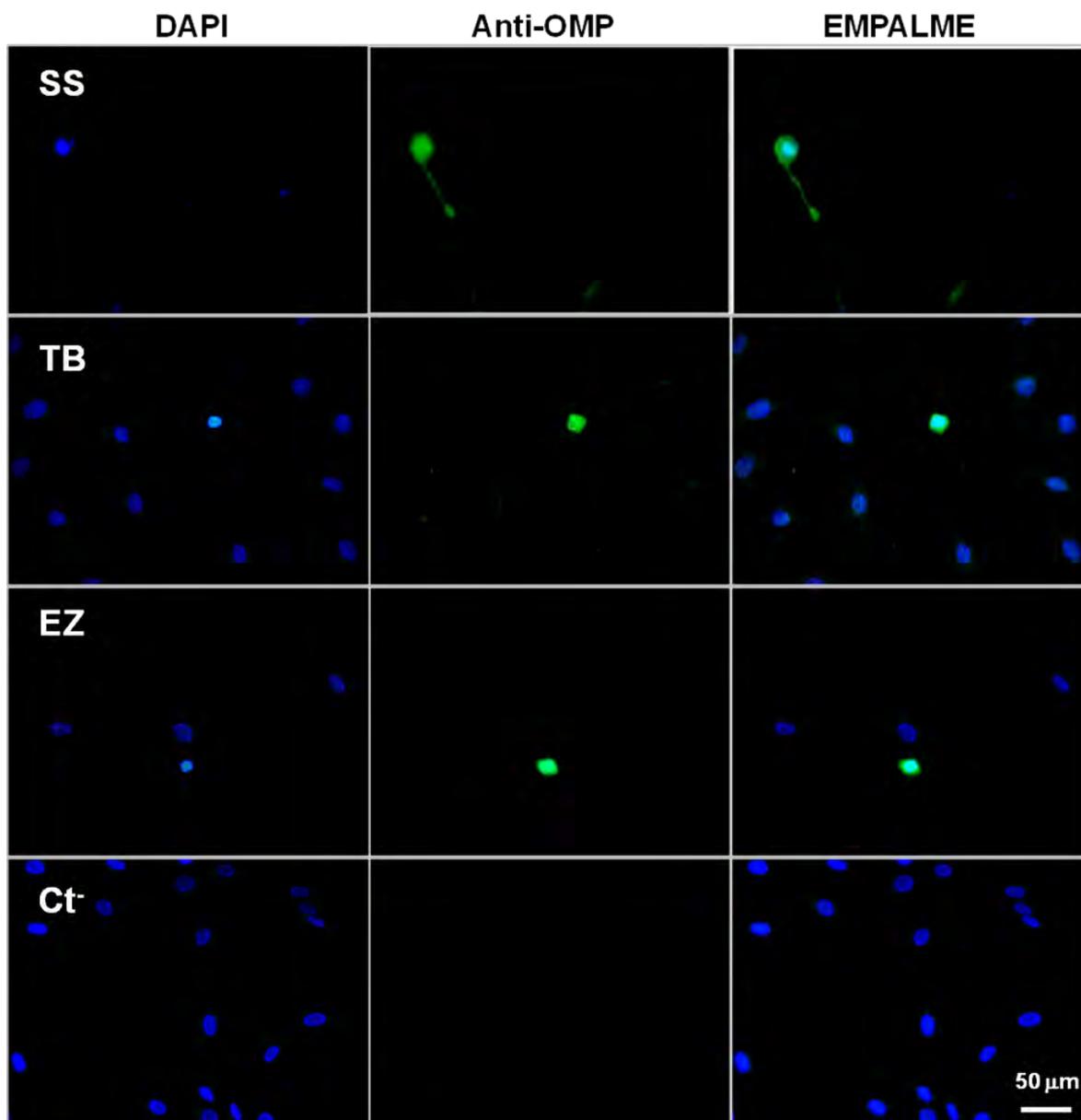


FIGURA 12. Identificación de las neuronas olfatorias en el cultivo primario del epitelio olfatorio obtenido de sujetos sanos y pacientes con trastorno bipolar o esquizofrenia. Las células del epitelio olfatorio se obtuvieron de sujetos sanos (SS) y de pacientes diagnosticados con trastorno bipolar (TB) o con esquizofrenia (EZ). Las células precursoras neuronales en pasaje 5 se cultivaron durante cuatro días. Posteriormente las células se fijaron y se incubaron con un anticuerpo anti-OMP y con un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). En el panel D se muestra el control negativo (Ct) obtenido incubando las células con la solución de incubación que no contenía el anticuerpo primario.

9.5 Registro de las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje en neuronas olfatorias

9.5.1 Estandarización del protocolo de registro

Con el objetivo de evaluar el funcionamiento de las neuronas olfatorias provenientes de los pacientes diagnosticados con TB o con EZ, se realizaron registros de las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje con la técnica de patch-clamp. Estas corrientes se aislaron sustituyendo el Ca^{2+} con Ba^{2+} y controlando el potencial de la membrana con pulsos comando despolarizantes. La corriente tipo L se estudió con el bloqueo selectivo de este tipo de canales con nifedipina.

Para estandarizar el protocolo del registro de las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje y las condiciones experimentales para registrar las corrientes tipo L, se realizaron experimentos en neuronas olfatorias del cultivo de las células obtenidas de un SS. En la figura 11A, se muestra un registro representativo de la corriente entrante sostenida evocada al fijar el voltaje de la membrana. En la curva $I-V$ se observa que la corriente máxima de Ba^{2+} se obtuvo a los -10 mV y el potencial de inversión se observó alrededor de los $+20$ mV (Figura 11B). La nifedipina bloqueó el 66% de la corriente máxima de Ba^{2+} y no modificó ni el voltaje de la corriente máxima ni el potencial de inversión (Figura 11B). Tanto los valores de la corriente máxima total como los valores de la corriente remanente registrada en presencia de nifedipina, fueron independientes del pasaje de cultivo (ANOVA, $p > 0.05$) (Figura 11C).

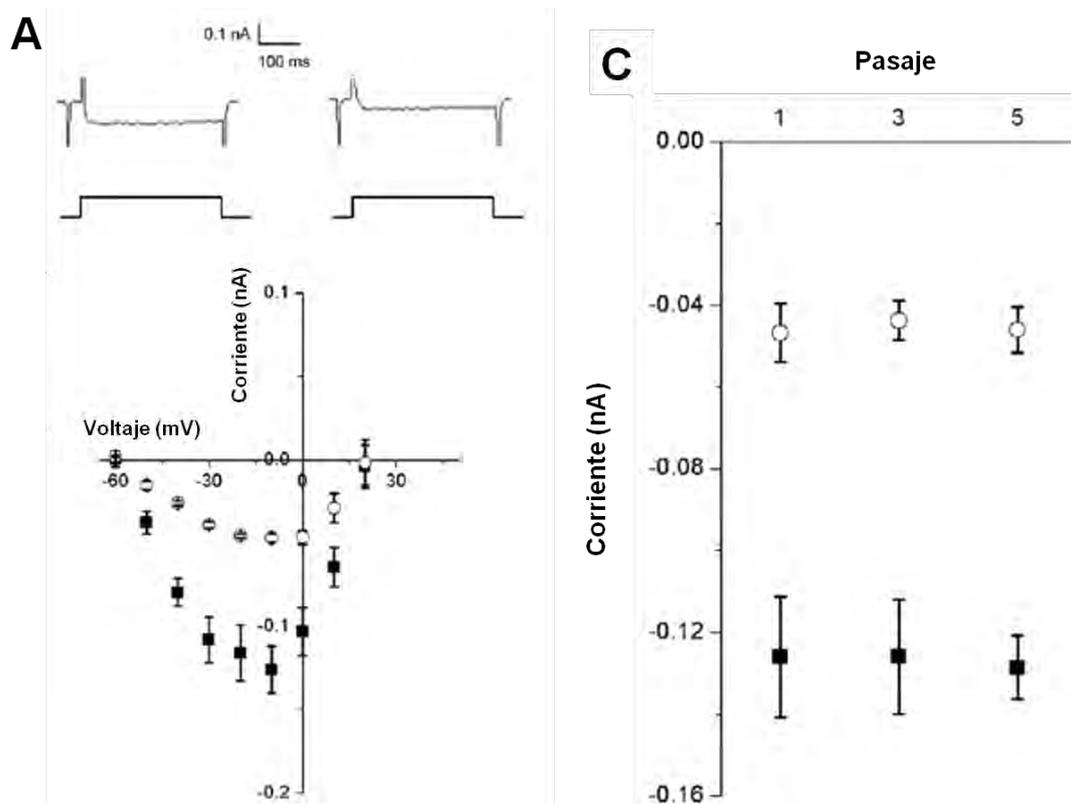


FIGURA 13. Caracterización del registro de las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje en neuronas olfatorias obtenidas de un sujeto sano. Las células del epitelio olfatorio, obtenidas de un sujeto sano se registraron al cuarto día de cultivo. Las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje se registraron mediante patch-clamp en su configuración de célula completa y la sustitución de Ca^{2+} con Ba^{2+} . Para estudiar la corriente tipo L, las células se perfundieron con nifedipina ($10 \mu\text{M}$). En el panel A se muestra a la izquierda, un registro representativo de la corriente total entrante de Ba^{2+} y a la derecha, un registro de la corriente remanente en presencia de nifedipina de células en pasaje 5. En el panel B se representa el cambio en la corriente cuando el voltaje de la membrana se fija desde -60 mV hasta $+50 \text{ mV}$ en pasos de 10 mV . En el panel C se muestra la comparación de la corriente de Ba^{2+} total o remanente, registrada manteniendo el voltaje en -10 mV en células en pasaje de cultivo 1, 3 o 5. La corriente total está representada con cuadros negros y la corriente remanente con círculos blancos; se muestra el valor de la media \pm el error estándar de 5 neuronas registradas.

Posteriormente, se determinó si el estado funcional de las neuronas olfatorias obtenidas de los pacientes con TB o EZ, se modificaba en distintos pasajes de cultivo. Las células en pasaje 1 o 5 obtenidas de tres pacientes con TB y 3 con EZ, se mantuvieron durante 4 días con medio DMEM suplementado y se registró la corriente total y la corriente remanente en presencia de nifedipina (Figura 12). No se detectaron diferencias significativas al comparar las corrientes de Ba^{2+} registradas

en las neuronas olfatorias obtenidas de los pacientes, ni en la corriente máxima total ni en la corriente remanente (ANOVA, $p > 0.05$) (Figura 12A). Tampoco se encontró diferencia al comparar la corriente remanente al bloquear la corriente total de Ba^{2+} con 1 o 10 μM de nifedipina (t de Student, $p > 0.05$) (Figura 12B). Estos resultados indicaron que la funcionalidad de las corrientes de Ca^{2+} en las neuronas olfatorias de los cultivos de los pacientes con TB o EZ no se modifica entre los primeros pasajes.

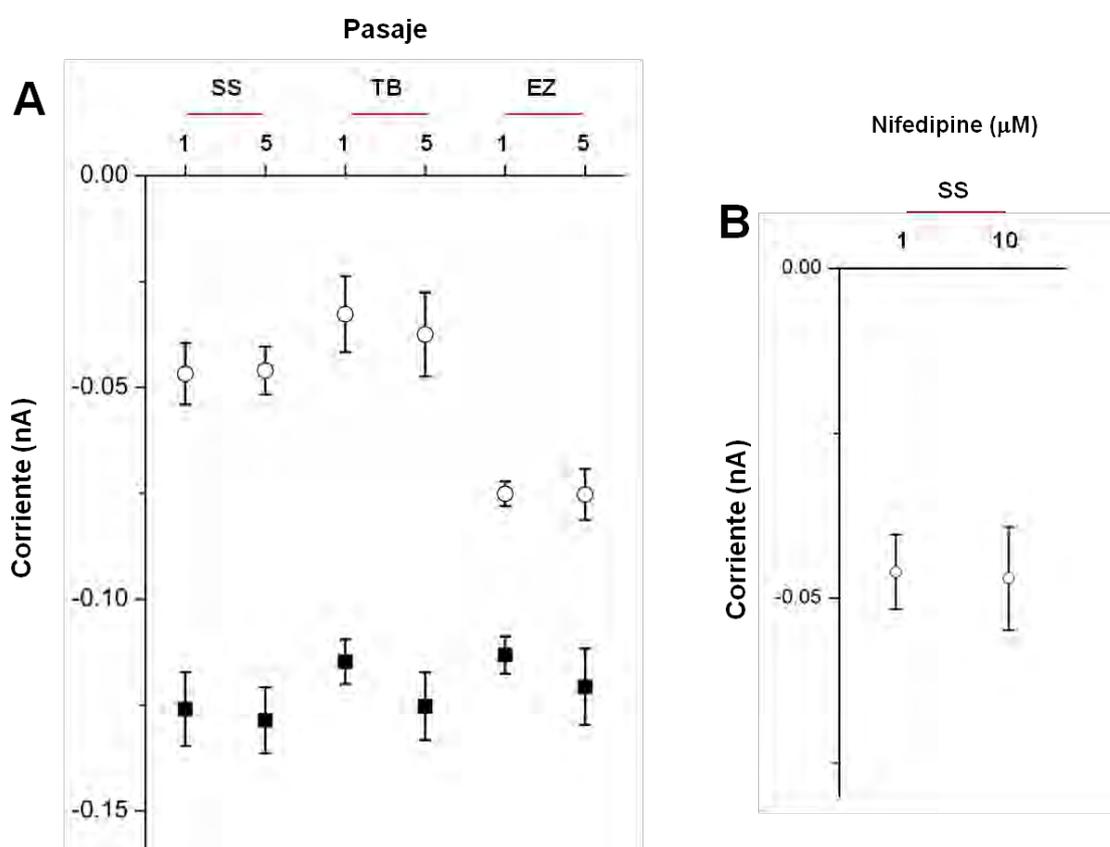


FIGURA 14. Corriente de Ca^{2+} dependiente de voltaje registrada en neuronas olfatorias obtenidas de sujetos sanos y pacientes con trastorno bipolar o esquizofrenia, en distintos pasajes de cultivo. Las células del epitelio olfatorio obtenidas de sujetos sanos (SS) y de pacientes con trastorno bipolar (TB) o esquizofrenia (EZ) se cultivaron durante cuatro días. En el panel A se muestra la amplitud de la corriente de Ba^{2+} registrada al fijar el voltaje en -10 mV, en neuronas olfatorias en el pasaje de cultivo 1 o 5. La corriente de Ca^{2+} tipo L se bloqueó con nifedipina y la corriente total o la corriente remanente se comparó entre pasajes con una prueba de ANOVA de una vía. En el panel B se observa la amplitud de la corriente remanente cuando las neuronas olfatorias se perfundieron con 1 o 10 μM de nifedipina. El efecto de la nifedipina se comparó con una prueba t de Student. La corriente total de Ba^{2+} está representada con cuadros negros y la corriente remanente con círculos blancos. Los resultados se representan con el valor de la media \pm el error estándar de 5 células por cada uno de tres sujetos de cada grupo.

9.5.2 Registro de las corrientes de Ca^{2+} y de la corriente tipo L en neuronas olfatorias de sujetos sanos y de pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia

El funcionamiento de las neuronas olfatorias en el cultivo de los 9 SS, los 9 pacientes diagnosticados con TB y los 9 con EZ, se determinó en células de pasaje 5 mantenidas en cultivo durante 4 días. No se encontraron diferencias en los parámetros obtenidos con la relación $I-V$, ni en el voltaje en que se alcanzó la corriente máxima, ni en el potencial de inversión (Figura 13). Tampoco se encontraron diferencias al comparar la capacitancia de las neuronas registradas o la resistencia de entrada (ANOVA, $p > 0.05$). Al comparar la corriente sensible a nifedipina obtenida fijando el voltaje de la membrana en -10 mV entre los SS y los pacientes con TB no se encontraron diferencias significativas (ANOVA y Tukey, $p > 0.05$) (Figura 14A, B y C). Respecto de los pacientes con EZ, la corriente bloqueada con nifedipina fue significativamente menor que en los otros dos grupos (ANOVA y Tukey, $p < 0.05$) (Figura 14A y C). Estos resultados sugieren que en las neuronas olfatorias en pasaje 5 registradas en el cultivo de las células de los SS y de los pacientes con TB, la corriente de Ca^{2+} tipo L es la predominante, pero no en las neuronas olfatorias del cultivo de los pacientes con EZ.

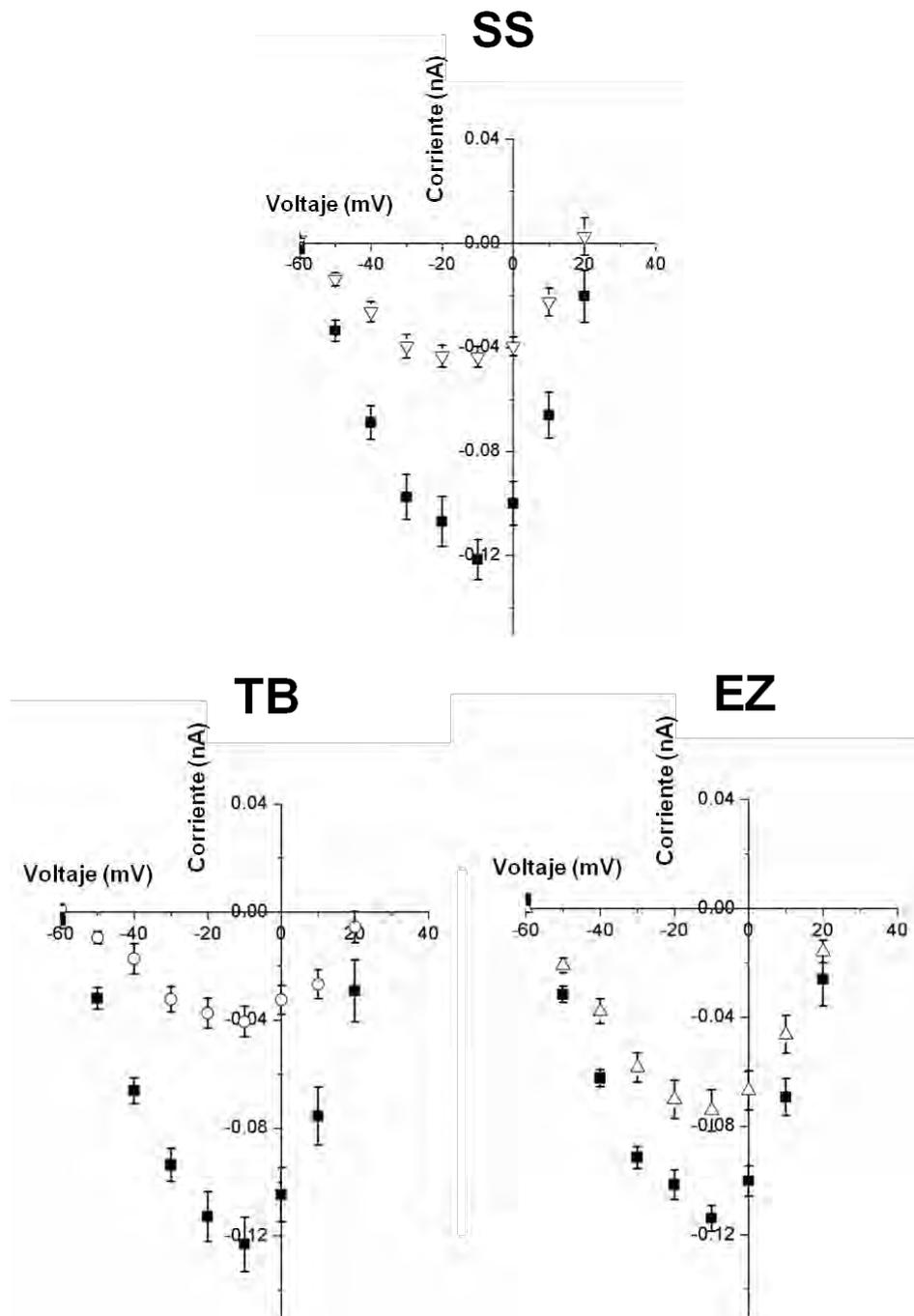


FIGURA 15. Registro de las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje en neuronas olfatorias de sujetos sanos y pacientes con trastorno bipolar o esquizofrenia. Las células del epitelio olfatorio se obtuvieron de sujetos sanos (SS) y de pacientes con trastorno bipolar (TB) o esquizofrenia (EZ). Los precursores neuronales en el pasaje de cultivo 5 se incubaron durante cuatro días. Se representa el cambio de la corriente de Ba^{2+} fijando el voltaje desde -60 mV hasta +20 mV con pasos de 10 mV y un potencial de fijación de -70 mV. Los cuadrados negros representan la corriente total de Ba^{2+} y los símbolos vacíos representan los valores de la corriente remanente registrada en presencia de nifedipina. La corriente total de Ba^{2+} está representada con cuadros negros y la corriente remanente con las figuras blancas. Los resultados representan la media \pm el error estándar de 5 células registradas por cada uno de los 9 sujetos por grupo.

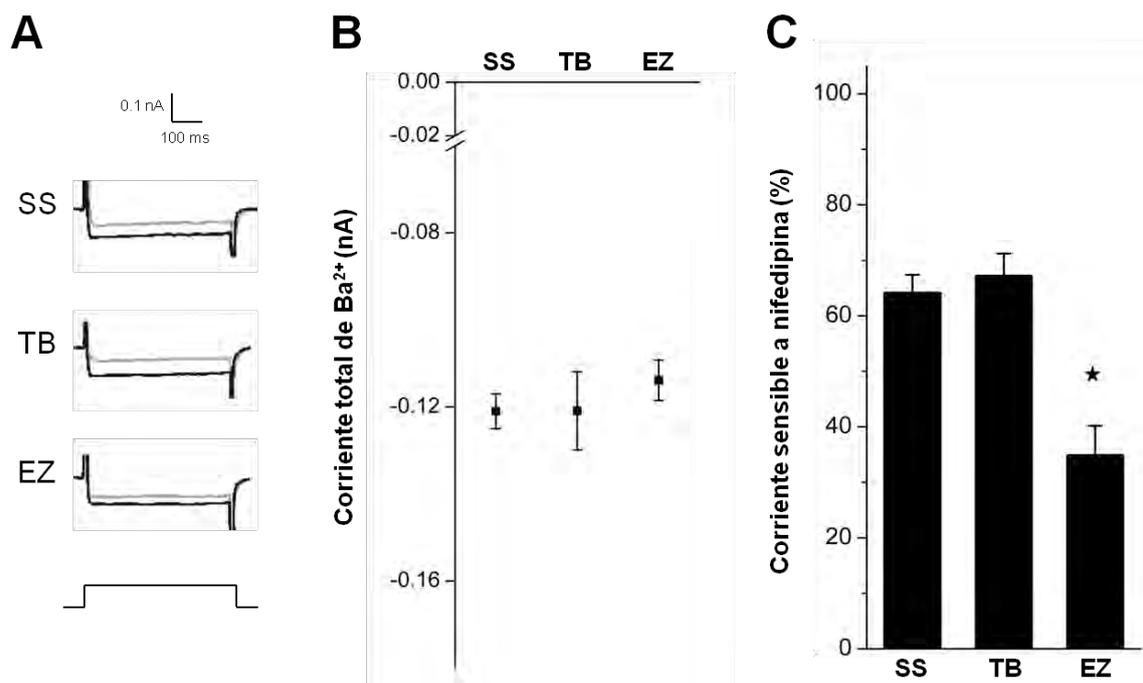


FIGURA 16. Registro de la corriente de Ca²⁺ tipo L en neuronas olfatorias de sujetos sanos y pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia. Las células del epitelio olfatorio se obtuvieron de sujetos sanos (SS) y de pacientes con trastorno bipolar (TB) o con esquizofrenia (EZ). Las células en el pasaje de cultivo 5 se mantuvieron en cultivo durante cuatro días. En la solución extracelular el Ca²⁺ se sustituyó con Ba²⁺ y las células se perfundieron con nifedipina 10 μ M para bloquear la corriente tipo L. Panel A: Registro representativo de la corriente total de Ba²⁺ (línea negra) y de la corriente remanente registrada en presencia de nifedipina (línea gris). Panel B: Valores de la corriente máxima obtenida al fijar el voltaje en -10 mV. Panel C: Porcentaje de la corriente sensible a nifedipina. El 100% correspondió a la corriente total de Ba²⁺. Los asteriscos indican diferencias significativas determinados aplicando una prueba de ANOVA de una vía. Los resultados se representan con el valor de la media \pm el error estándar. De cada grupo se obtuvieron las células de 9 sujetos y de cada sujeto se registraron 5 neuronas.

Para determinar si los cambios observados en la corriente tipo L variaban con el género, se compararon los valores de la corriente máxima total de Ba²⁺ o de la corriente remanente registrada en presencia de nifedipina entre los sujetos de género masculino o femenino. No se observaron diferencias significativas ni en los pacientes con esquizofrenia (4 mujeres y 4 hombres) ni en los sujetos con trastorno bipolar (5 mujeres y 3 hombres) (ANOVA, $p > 0.05$) (Figura 15).

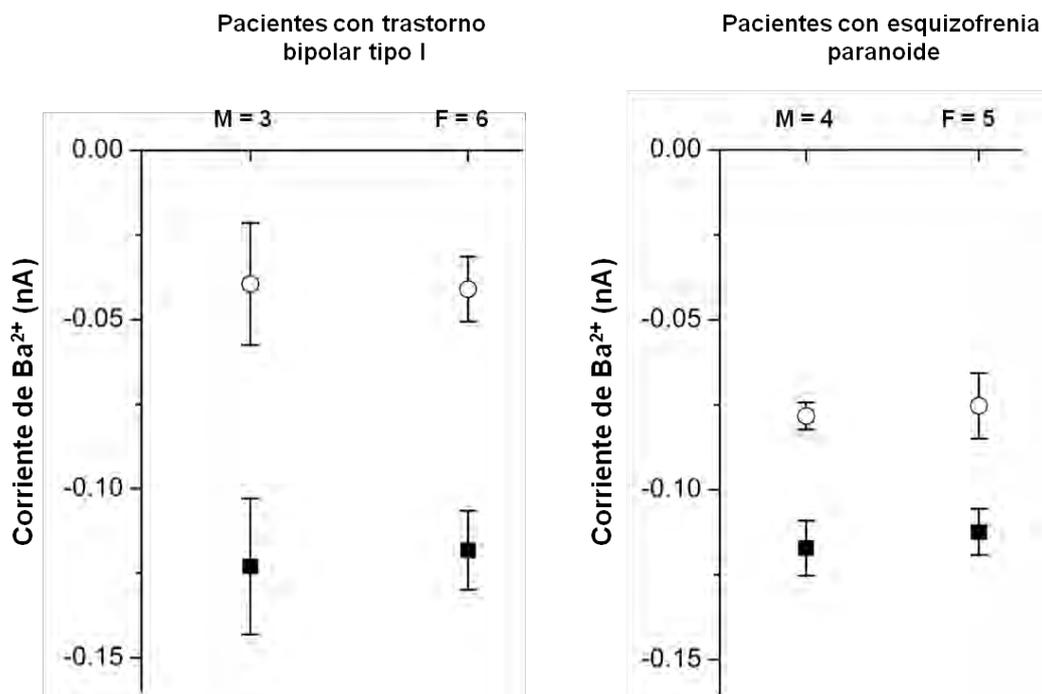


FIGURA 17. Corriente de Ca²⁺ activada por voltaje tipo L en neuronas olfatorias de pacientes con trastorno bipolar o esquizofrenia de género masculino o femenino. Las células del epitelio olfatorio se obtuvieron de sujetos sanos (SS) y pacientes con trastorno bipolar (TB) o esquizofrenia (EZ). Las células en el pasaje 5 se cultivaron durante cuatro días. Las corrientes de Ca²⁺ activadas por voltaje se registraron mediante la técnica de "Patch-clamp" en su configuración de célula completa, controlando el voltaje de la membrana con pulsos comando despolarizantes. La corriente tipo L se bloqueó con nifedipina. En los paneles A y B se muestran los valores de la corriente de Ba²⁺ cuando el voltaje de la membrana se controló en -10 mV. Se comparó la corriente total o la corriente remanente entre los sujetos de género masculino (M) o femenino (F) mediante una prueba t de Student. La corriente total de Ba²⁺ se representó con cuadrados negros y la corriente remanente en presencia de nifedipina se representó con los círculos blancos. Los resultados se representan con el valor de la media \pm el error estándar de cinco células registradas por cada uno de los sujetos.

9.6 Marcaje de los canales de Ca²⁺ tipos L y N en las células del cultivo primario

La presencia de los canales tipo L en las células del epitelio olfatorio obtenidas de los SS y de los pacientes diagnosticados con TB o con EZ, se corroboró con la tinción de la subunidad alfa₁ de los canales mediante la técnica de inmunofluorescencia. Con el objetivo de determinar si otro tipo de canales de Ca²⁺ activados por voltaje son expresados en estas células, también se tiñeron los

canales de Ca^{2+} tipo N. En las imágenes obtenidas se observó que el 2% de las células teñidas con DAPI fueron positivas a los anticuerpos anti-canales L y anti-canales N, tanto en los SS como en los pacientes con TB o con EZ (Figura 17).

La densidad de las células teñidas con los anticuerpos anti-OMP y anti-canales tipo L fue similar. Esta evidencia nos llevo a plantear la hipótesis de que los canales tipo L se expresan específicamente en las neuronas olfatorias maduras del cultivo. Para confirmar esta hipótesis se realizó una inmunofluorescencia de doble tinción incubando las células simultáneamente con los anticuerpos anti-OMP y anti-canales tipo L. En las imágenes obtenidas con esta tinción, se observó que la OMP y los canales tipo L son expresados en las mismas células (Figura 18). Esta evidencia confirmó nuestra hipótesis y sugiere que los canales L no son expresados en los precursores neuronales. Al parecer, nos confirma también que los rasgos morfológicos observados en las células positivas al anticuerpo anti-OMP, permitieron identificar a las neuronas olfatorias del cultivo para realizar los registros eléctricos.

La densidad de las células teñidas con el anticuerpo anti-canales N fue similar a la de las células teñidas con el anticuerpo anti-canales L. Para determinar si los dos tipos de canales se expresan en las mismas células, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia simultánea de doble tinción con un anticuerpo que reconoce la subunidad α_1 de los canales tipo L y otro anticuerpo que reconoce a los canales tipo N (Figura 19). En las imágenes obtenidas se confirmó que los dos tipos de canales se expresan en las mismas células. Este resultado sugiere que la corriente de Ba^{2+} remanente registrada en presencia de nifedipina, depende al menos de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje tipo N.

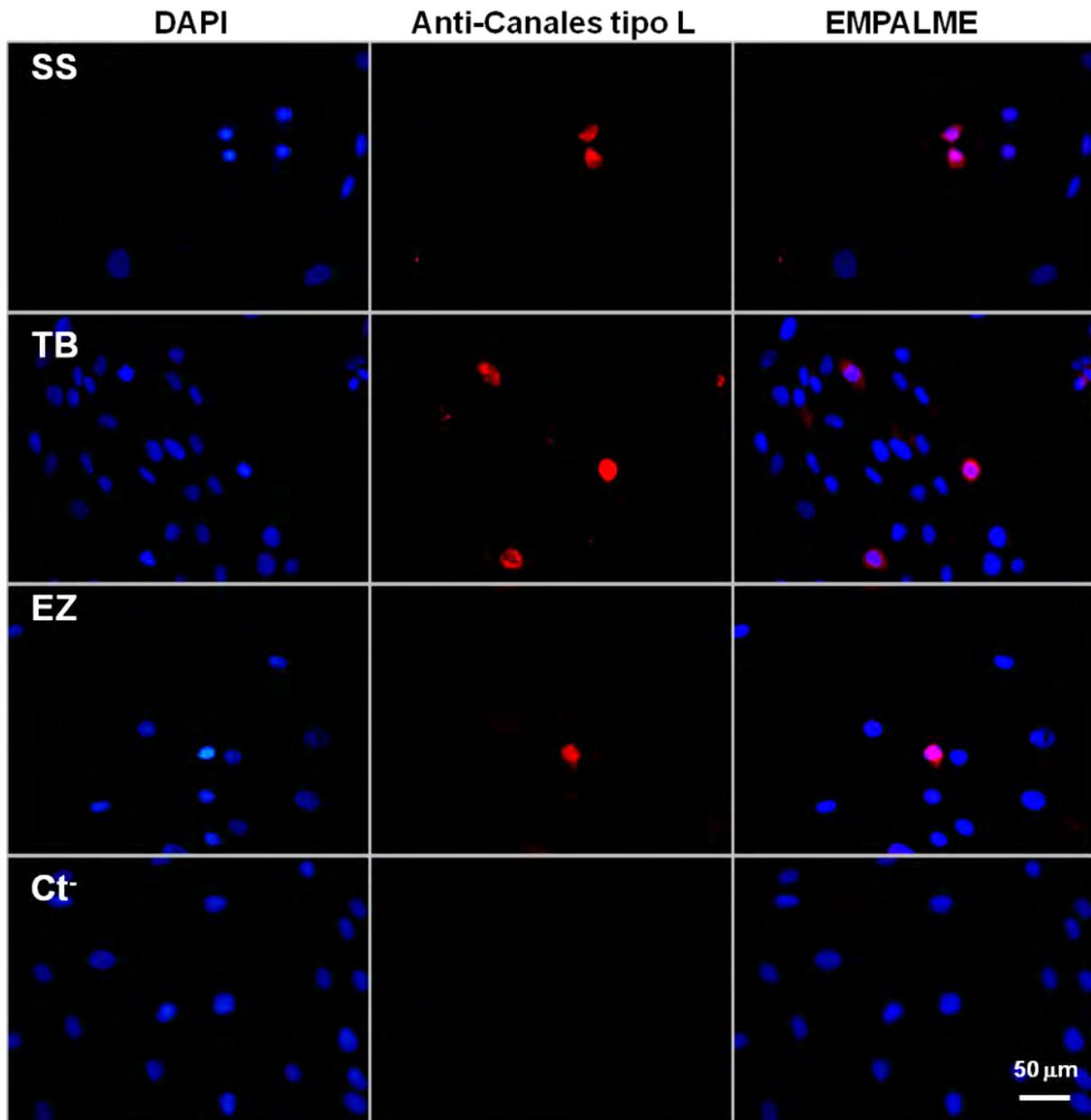


FIGURA 18. Inmunodetección de los canales tipo L en células del epitelio olfatorio obtenidas de los sujetos sanos y de los pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia. Las células del epitelio olfatorio se obtuvieron de los sujetos sanos (SS) y de los pacientes con trastorno bipolar (TB) o con esquizofrenia (EZ). Las células en pasaje 5 se cultivaron durante cuatro días y se fijaron con paraformaldehído al 4%. Después de permeabilizar las células, se incubaron con un anticuerpo primario policlonal anti-canales L y posteriormente con un anticuerpo secundario acoplado a rodamina (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). En el panel D se muestra el control negativo (Ct) obtenido incubando las células durante 2 h con la solución de incubación que no contenía el anticuerpo primario.

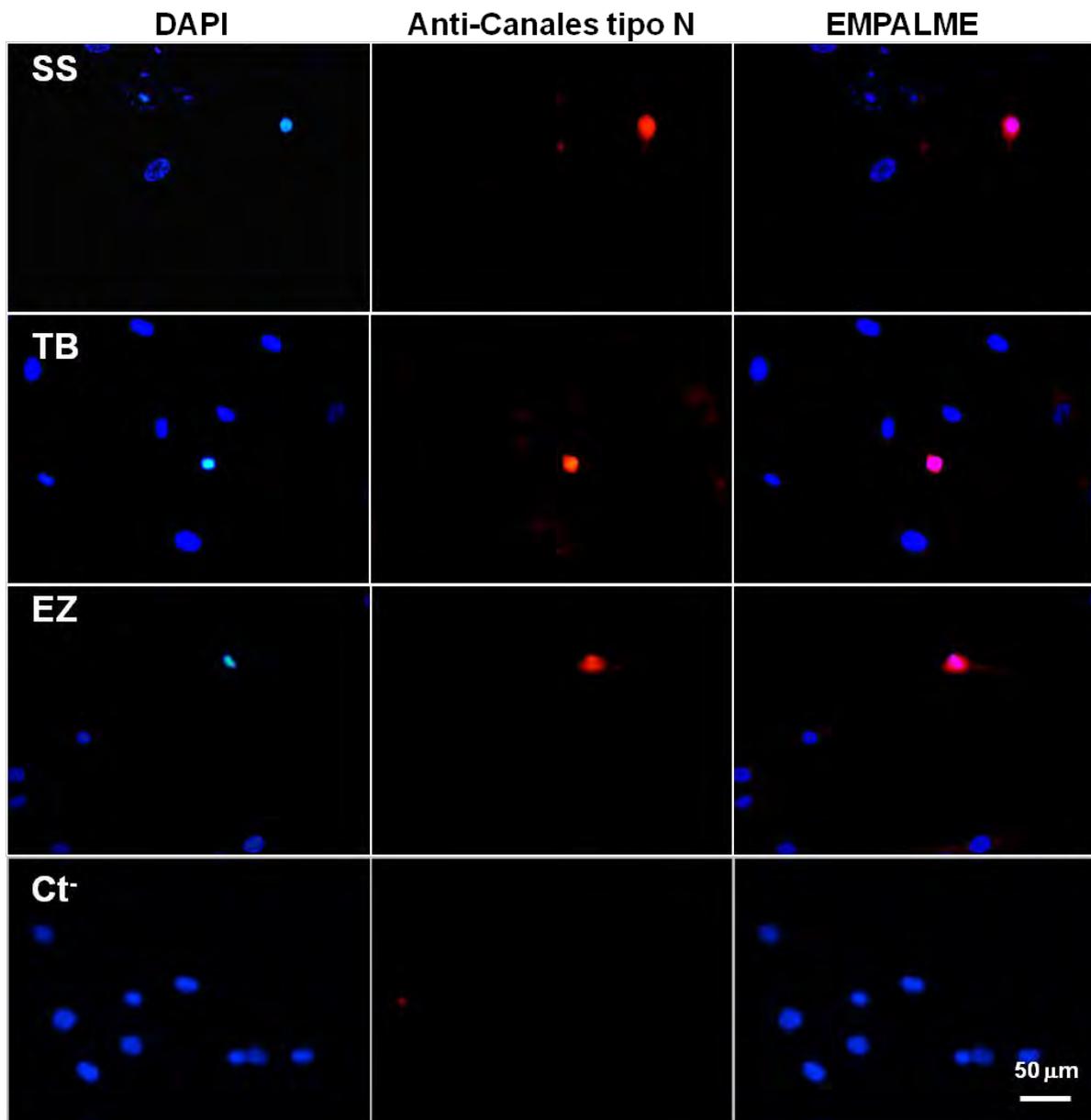


FIGURA 19. Inmunodetección de los canales tipo N en células del epitelio olfatorio obtenidas de los sujetos sanos y de los pacientes con trastorno bipolar o con esquizofrenia. Las células del epitelio olfatorio se obtuvieron de los sujetos sanos (SS) y de los pacientes con trastorno bipolar (TB) o con esquizofrenia (EZ). Las células se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-canales N, con un anticuerpo secundario acoplado a rodamina (rojo) y con DAPI para teñir los núcleos (azul). En el control negativo (Ct), las células se incubaron con la solución de incubación sin el anticuerpo primario.

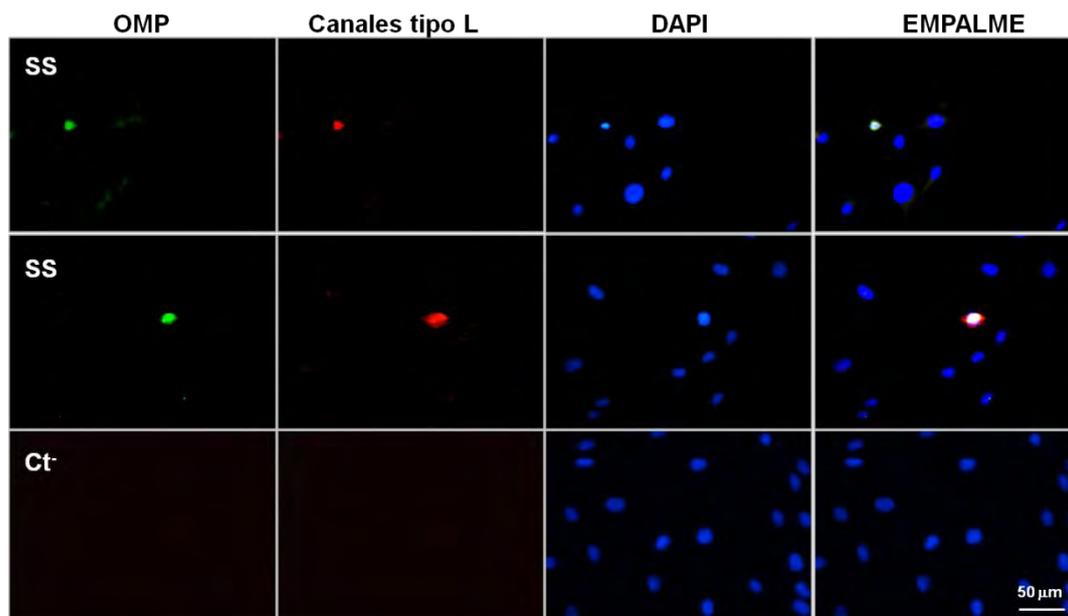


FIGURA 20. Inmunodetección de los canales de Ca^{2+} tipo L en las neuronas olfatorias del cultivo primario. Las células de un sujeto sano (SS) se cultivaron durante cuatro días y después de fijarlas se incubaron simultáneamente con un anticuerpo anti-OMP y con otro anti-canales tipo L durante toda la noche. La OMP se tiñó con un anticuerpo acoplado a fluoresceína (verde) y los canales con un anticuerpo acoplado a rodamina (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). En el control negativo (Ct) se omitió la incubación con los anticuerpos primarios.

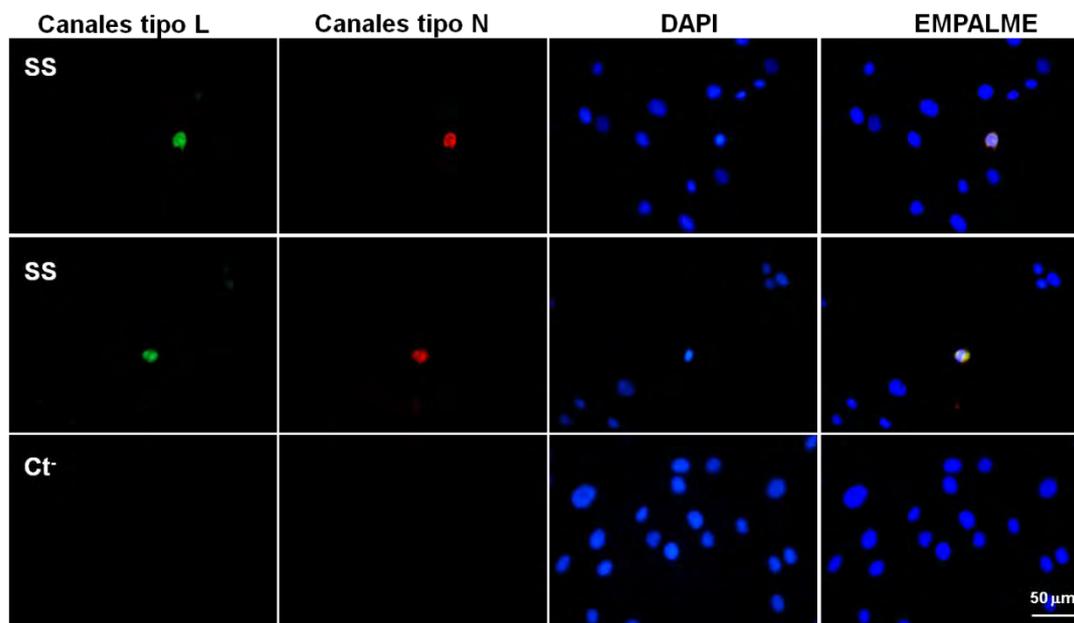


FIGURA 21. Detección de los canales tipos L y N en el cultivo primario. Las células del epitelio olfatorio de un sujeto sano (SS) se fijaron y se incubaron simultáneamente con el anticuerpo anti-canales tipo L y con un anticuerpo anti-canales tipo N. Los canales L se tiñeron con un anticuerpo acoplado a fluoresceína (verde) y los canales N con un anticuerpo acoplado a rodamina (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). En el control negativo (Ct) se omitió la incubación con el anticuerpo primario.

10. DISCUSIÓN

En este estudio se demostró que las células precursoras de estirpe neuronal del epitelio olfatorio obtenidas de los pacientes con TB tipo I o con EZ tipo paranoide, tienen una alteración en la organización de los microtúbulos. En las células obtenidas de los pacientes con TB se observaron microtúbulos con una longitud menor en relación a las células de los SS. Por su parte, en las células obtenidas de los pacientes con EZ se encontró que la red microtubular ocupa un espacio citoplasmático 5 veces menor comparada con la red de los precursores neuronales de los SS. Adicionalmente, en las células de los pacientes con TB se encontró una menor cantidad de tubulina β III total y también una menor cantidad de tubulina globular, mientras que en las células de los pacientes con EZ no se encontraron diferencias en la cantidad de esta proteína en relación a los SS. En las neuronas olfatorias de los mismos pacientes con EZ, diferenciadas espontáneamente en el cultivo, se encontró una disminución en la amplitud de la corriente de Ca^{2+} activada por voltaje tipo L. Estos resultados indican que la desorganización del citoesqueleto observada en las células precursoras de los pacientes con TB tuvo características distintas de la encontrada en las células de los pacientes con EZ, lo que sugiere que los factores que la causan son distintos en cada uno de los trastornos. Además, en las células de estirpe neuronal de los pacientes con EZ ocurre una asociación entre la organización de los microtúbulos y la funcionalidad de los canales tipo L.

10.1 Caracterización del linaje de las células del cultivo primario

Las neuronas sensoriales del epitelio olfatorio expresan la proteína vimentina para constituir los filamentos intermedios y la isoforma β III de la tubulina para polimerizar los microtúbulos (Schowb, et al 1986; Roskams et al., 1998). En este estudio se

demostró que las células obtenidas por exfoliación de la cavidad nasal de los SS y de los pacientes con TB o con EZ son de linaje neuro-olfatorio, ya que las dos proteínas fueron detectadas con el método de inmunofluorescencia en los cultivos primarios: el 100% de las células fueron inmunopositivas a la vimentina y el 98% a la tubulina β III. Además de estas dos proteínas, en un estudio previo se demostró que las células del cultivo primario obtenido por raspado nasal expresan las proteínas nestina (>80% del total de las células), GFAP (por sus siglas en inglés "Glial fibrillary acidic protein") (<1% del total) y Neu-N (por su nombre en inglés "Neuronal Nuclei") (16% del total) aún en el pasaje de cultivo 11 (Benítez-King et al., 2011).

La nestina se ha caracterizado como un marcador de las células precursoras pluripotenciales del giro dentado hipocampal y de la zona subventricular del SNC. A partir de estas células se generan nuevas neuronas maduras en la etapa adulta, que se integran a los circuitos del hipocampo y de los bulbos olfatorios, respectivamente (Lagace et al., 2007; Giachino y Taylor, 2009; Decarolis et al., 2013; Logan et al., 2013). La proteína GFAP es un marcador de las células de estirpe glial (Babu et al., 2011; Logan et al., 2013) y la proteína Neu-N es un marcador de las neuronas maduras (Mullen et al., 1992; Ransome y Hannan, 2013). Los resultados obtenidos en este trabajo y los encontrados previamente, sugieren que las células mitóticas de linaje neuronal detectadas en el cultivo primario, provienen del epitelio olfatorio y tienen la característica de ser precursoras pluripotenciales, ya que al parecer se pueden diferenciar y madurar en células neuronales o gliales (Roisen et al., 2001; Zhang et al., 2004; Zhang et al., 2006; Benítez-King et al., 2011).

Lo anterior nos indica que la caracterización de la organización de los microtúbulos, se realizó predominantemente en la población de células precursoras neuronales del epitelio olfatorio, tanto en el cultivo obtenido de los SS como en el obtenido de los pacientes con TB tipo I o con EZ tipo paranoide.

10.2 Caracterización de la organización del citoesqueleto en los precursores neuronales olfatorios

La estructura y la dinámica de los microtúbulos se modulan, entre otros factores, por el equilibrio entre las concentraciones de la tubulina polimerizada y de la tubulina en forma globular. En este sentido se ha determinado que el incremento en la longitud de los microtúbulos al parecer depende del aumento en la concentración de la tubulina globular (Hyman et al., 1992; Margolin et al., 2012). Otro factor que modula la organización microtubular es la interacción de las proteínas MAPs con los protofilamentos de tubulina o con la pared externa de los microtúbulos ensamblados (Cleveland and Havercroft, 1983; Katz et al., 1990; Halpain and Dehmelt, 2006). La unión de las MAPs al citoesqueleto es dependiente de los dominios de unión a tubulina localizados cerca de la región carboxilo terminal y disminuye la frecuencia de aparición de los eventos de despolimerización de los microtúbulos, conocidos como episodios de catástrofe y con ello se favorece el mantenimiento de la estabilidad de la longitud de los túbulos ensamblados.

Adicionalmente, la unión de las MAPs regula la separación entre los microtúbulos que se polimerizan siguiendo una dirección paralela (Chen et al., 1992; Hirokawa, 1994) y de esta forma regula la organización tridimensional de la red microtubular. En ausencia de las MAPs generada por modificaciones genéticas, la distancia entre

los microtúbulos es irregular y ocurre una desorganización de la red microtubular, modificando incluso la arquitectura celular (Teng et al., 2001). También, la unión de las MAPs con los microtúbulos es dependiente de su estado de fosforilación, cuando las MAPs son fosforiladas cambia alostéricamente la afinidad de los dominios de unión a tubulina (Cassimeris y Spittle, 2001; Halpain and Dehmelt, 2006; Wang y Liu, 2008).

En este estudio se encontró que los microtúbulos de los precursores neuronales de los pacientes con TB o con EZ, teñidos con el anticuerpo que reconoce a la isoforma neuronal de la tubulina β , tienen una organización alterada. Esto podía ser debido a una disminución en la cantidad de tubulina polimerizada. Sin embargo, cuando se separó la tubulina ensamblada en microtúbulos de la tubulina globular por centrifugación diferencial y se cuantificó la tubulina contenida en éstas dos fracciones subcelulares mediante Western blot y densitometría, se observó que en los precursores obtenidos de los pacientes con EZ el contenido de tubulina polimerizada y globular, e incluso de la tubulina total, fue similar respecto del cuantificado en los SS.

Lo anterior, nos indica que la causa que explica la alteración de la organización de los microtúbulos en las células de los pacientes con EZ no es debida a que las subunidades de tubulina son escasas sino a una deficiencia en su organización tridimensional, posiblemente debida a una menor expresión de las MAPs. En este sentido, se ha descrito una expresión baja de las MAPs en el subiculum (Rosoklija et al., 2000), en la corteza entorrinal (Arnold et al, 1991), el hipocampo (Cotter et al.,

1997), la corteza prefrontal (Jones et al, 2002) y los bulbos olfatorios (Rioux et al, 2004) de los pacientes con esta enfermedad neuropsiquiátrica.

En el caso de los precursores neuronales obtenidos de los pacientes con TB, se encontró una menor cantidad de tubulina total y de tubulina globular, sugiriendo que la menor longitud de los microtúbulos ensamblados en estos precursores, está asociada con la menor concentración de tubulina disponible para el proceso de polimerización (Hyman et al., 1992; Margolin et al., 2012).

Los resultados indican que los precursores obtenidos de los pacientes con TB tipo I o con EZ tipo paranoide presentan una desorganización en los microtúbulos aunque con características diferentes, lo que sugiere que en cada trastorno neuropsiquiátrico es causada por factores distintos. En las células de los pacientes con EZ la desorganización microtubular está asociada con cambios estructurales a nivel de la organización tridimensional de los microtúbulos en tanto que en las células de los pacientes con TB la desorganización está asociada con la accesibilidad de tubulina para construir los microtúbulos.

10.3 Caracterización de la corriente de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo L en neuronas olfatorias

El estudio de la corriente de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo L se abordó con una estrategia farmacológica, al sustituir el Ca^{2+} por el Ba^{2+} y con la utilización de un bloqueador selectivo de los canales tipo L, la nifedipina. El bloqueador se probó en dos concentraciones (1 y 10 μM) en las que previamente se ha demostrado un bloqueo efectivo de la corriente tipo L (Rane et al., 1987; Kohlmeier et al., 2008; Ma

et al., 2009). No se detectaron diferencias significativas en el efecto provocado por la perfusión de estas dos concentraciones de nifedipina sobre la corriente de Ba^{2+} evocada por los pulsos despolarizantes, lo que sugiere que la nifedipina utilizada bloqueó específicamente la corriente de Ba^{2+} a través de los canales tipo L. Además, la corriente entrante de Ba^{2+} evocada por los pulsos despolarizantes fue sostenida tal como se ha reportado en otros estudios (Rane et al., 1987; Randall, 1995; Wakamori et al., 1998).

Los registros de la corriente de Ca^{2+} activada por voltaje se llevaron a cabo en las neuronas olfatorias que se caracterizaron con criterios morfológicos, a partir de la tinción de las células del cultivo primario con un anticuerpo que reconoce a la proteína OMP. Esta proteína se ha utilizado como un marcador de las neuronas olfatorias maduras tanto en cortes histológicos como en células disociadas o en cultivo obtenidas del neuroepitelio olfatorio por biopsia (Margolis et al. 1982; Rogers et al., 1987; Danciger et al., 1989; Krishna et al., 1995). En estos estudios se ha encontrado que las neuronas olfatorias son de tipo bipolar tal como las células que se tiñeron en nuestros cultivos y que se seleccionaron para determinar la funcionalidad de la corriente de Ca^{2+} .

Además del registro de la actividad eléctrica, la expresión de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje tipos L y N se corroboró mediante ensayos de inmunofluorescencia en las neuronas olfatorias maduras. En estos ensayos se encontró que los canales solo se expresan en las células OMP-positivas de los SS y de los pacientes con TB o con EZ. Estos resultados nos confirman que las células

seleccionadas por su morfología para realizar los registros eléctricos son las neuronas sensoriales maduras del epitelio olfatorio.

En otros estudios se ha observado que la amplitud de la corriente de Ca^{2+} puede variar respecto del número de días que las neuronas aisladas se mantienen en cultivo (Randall, 1995). Como los experimentos en este trabajo se realizaron en neuronas olfatorias en pasaje 5, primero se determinó que la amplitud de la corriente de Ca^{2+} no presentara diferencias significativas entre pasajes. Todos los registros de la actividad eléctrica se realizaron después de tres días de iniciado el cultivo del quinto pasaje. No se detectó variación en la corriente al compararla entre pasajes, debido posiblemente a que las neuronas olfatorias registradas en cada pasaje maduraron después de que las células precursoras se sembraron. En este sentido, se ha demostrado que las neuronas olfatorias maduran espontáneamente en el cultivo de las células precursoras olfatorias obtenidas por biopsia, incrementando su número a partir del tercer día después de que son sembradas. Para comprobar que estas neuronas maduran en el cultivo se añade en el medio una molécula análoga del nucleótido uridina trifosfato, la bromodesoxiuridina (BrdU) que se inmunodetecta con un anticuerpo específico. El BrdU se incorpora al ADN de las células mitóticas durante la fase S del ciclo celular y este nucleótido se ha detectado en las células OMP-positivas, lo que indica que las neuronas olfatorias maduraron bajo las condiciones del cultivo (Hahn et al., 2005; Rawson y Ozdener, 2013). En los trabajos donde se ha detectado variación en la amplitud de la corriente, las neuronas en estado maduro se han disociado para ser cultivadas y registradas.

En otros trabajos en los que se ha registrado la corriente de Ca^{2+} activada por voltaje en neuronas olfatorias maduras, obtenidas por biopsia de humanos o de ratas, se ha encontrado que la corriente tipo L es la predominante (Rawson et al, 1997; Shiraiwa et al., 2007). En este trabajo se encontró que en las neuronas olfatorias de los SS y de los pacientes con TB, la corriente sensible a nifedipina aportó el 66% de la corriente total de Ba^{2+} , aunque en las neuronas olfatorias obtenidas de los pacientes con EZ la corriente sensible a nifedipina fue del 33% del total, es decir fue 50% menor que la registrada en las neuronas de los SS o de los pacientes con TB. No se encontraron diferencias en la amplitud de la corriente entre pasajes de cultivo, lo que sugiere que las diferencias encontradas en la corriente de Ca^{2+} tipo L no dependen del pasaje ni de otras condiciones del cultivo.

En otros estudios se ha observado que la organización de los microtúbulos modula distintos tipos de canales iónicos como los canales de Na^+ activados por voltaje (Casini et al., 2010), los canales TRPV4 (por sus siglas en inglés “transient receptor potential vanilloid 4”) (Goswami et al., 2010) y los canales de Ca^{2+} activados por voltaje tipo L (Johnson and Byerly 1993, 1994; Pascarel et al., 1999; Malan et al., 2003). La despolimerización de los microtúbulos con concentraciones crecientes de colchicina está asociada con una disminución gradual en la corriente de Ca^{2+} tipo L en miocitos cardiacos (Pascarel et al., 1999; Malan et al., 2003) o en neuronas (Johnson and Byerly, 1993, 1994), en tanto que la estabilización de los microtúbulos con taxol restablece la magnitud de la corriente.

En este trabajo se encontró una asociación entre la disminución de la amplitud de la corriente de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo L y la desorganización de la estructura

tridimensional de los microtúbulos en las células neuronales obtenidas de los pacientes con EZ. Esta evidencia sugiere de manera indirecta que los microtúbulos podrían modular la funcionalidad de los canales tipo L. En las células de estos pacientes, el espacio celular en que se extiende la red microtubular fue 5 veces menor que en los SS y dos veces menor que en los pacientes con TB. A pesar de que en las células de los pacientes con TB se observaron microtúbulos cortos, no se detectaron diferencias en la amplitud de la corriente tipo L. Esto puede explicarse por la diferencia en la magnitud de la desorganización tridimensional del citoesqueleto, o por alguna causa adicional como una reducción en la densidad de los canales debido a un tráfico anormal de las proteínas (Tuckwell, 2011).

En este estudio, la organización de los microtúbulos se caracterizó en las células precursoras de estirpe neuronal debido a que al adoptar una morfología extendida en el cultivo es posible observar claramente la red microtubular en el microscopio de fluorescencia, a diferencia de las neuronas olfatorias maduras en las que la red es compacta. La corriente de Ca^{2+} tipo L no se estudio en las células precursoras porque no se obtuvieron registros electrofisiológicos. Por esto se analizó la expresión de los canales detectándolos con anticuerpos específicos mediante el método de inmunofluorescencia. En las imágenes obtenidas con esta técnica se observó que los canales de Ca^{2+} tipos L y N sólo se expresan en células OMP-positivas, lo que indica que su expresión es dependiente del estado de desarrollo de las células, tal como se ha observado en otros tipos neuronales (Montaño et al., 2008; Yamashita, 2012).

10.4 La organización del citoesqueleto y la corriente tipo L como biomarcadores de diagnóstico del trastorno bipolar y la esquizofrenia

En las células precursoras de los pacientes con TB se encontró una menor cantidad de tubulina globular, mientras que en las células neuronales de los pacientes con EZ se encontró una alteración en la organización tridimensional de la red de microtúbulos y una disminución en la corriente de Ca^{2+} tipo L. Estas diferencias que resultaron ser específicas de cada trastorno neuropsiquiátrico, abren la posibilidad de que la organización microtubular y la corriente tipo L puedan ser caracterizadas en un número mayor de casos, con el objetivo de establecer un conjunto de biomarcadores que permitan realizar un diagnóstico diferencial de los pacientes con TB o con EZ.

Al parecer, estas características biológicas permitirían establecer un protocolo de detección adecuado puesto que se encontraron diferencias significativas con un tamaño de muestra reducido, tanto en una aproximación al comparar entre casos y controles, como entre sujetos con dos trastornos distintos pero que presentan cuadros clínicos semejantes. Además, la dispersión de los valores obtenidos al medir estas dos características biológicas es baja, lo que posibilita el establecimiento de criterios numéricos para la detección de los pacientes tales como los límites mínimo o máximo, así como el intervalo en las funciones de los SS para contrastarlos con los valores de los sujetos que presentan un trastorno neuropsiquiátrico.

11. CONCLUSIONES

La exfoliación de la cavidad nasal de los SS y de los pacientes con TB tipo I o con EZ tipo paranoide, permite aislar células de linaje neuronal provenientes del epitelio olfatorio. En el cultivo primario de estas células predominan los precursores neuronales y una parte de las células postmitóticas se diferencian y maduran espontáneamente en neuronas olfatorias.

La organización del citoesqueleto de las células precursoras neuronales obtenidas de los pacientes con TB tipo I o con EZ tipo paranoide está alterada, aunque de modo diferencial. En los pacientes con TB se encontró que la red microtubular ocupa un espacio citoplasmático menor que en los SS, al parecer debido a la menor concentración de tubulina globular disponible para el proceso de polimerización. En cambio, en las células de los pacientes con EZ se encontró que el menor espacio citoplasmático ocupado por la red microtubular respecto de los pacientes con TB, al parecer se debe a una deficiencia en su organización tridimensional.

Las neuronas olfatorias diferenciadas espontáneamente en el cultivo primario, expresan canales de Ca^{2+} activados por voltaje. No se encontraron diferencias significativas en la amplitud máxima de las corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje, ni en el potencial de inversión entre las neuronas olfatorias de los SS y las neuronas de los pacientes con TB tipo I o con EZ tipo paranoide.

En las neuronas olfatorias diferenciadas en el cultivo obtenido de los pacientes con EZ tipo paranoide, se presenta una disminución en la amplitud de la corriente de

Ca²⁺ tipo L que es independiente del género de los sujetos. Esta disfunción no se presenta en las neuronas olfatorias de los pacientes con TB tipo I.

La organización de los microtúbulos y la corriente de Ca²⁺ activada por voltaje tipo L, tienen un alto potencial para ser considerados como biomarcadores de rasgo útiles en el diagnóstico del TB tipo I y de la EZ tipo paranoide.

12. PERSPECTIVAS

Se han planteado diversas hipótesis para explicar la etiología de las enfermedades neuropsiquiátricas, en las que se asocia la presencia de estos trastornos con anomalías en el neurodesarrollo o con la disfunción de algunos mecanismos involucrados en la comunicación neuronal. El epitelio olfatorio, al igual que la zona subventricular y el giro dentado hipocampal, es una estructura en la que se ha demostrado la proliferación y diferenciación de las neuronas aún durante la etapa adulta. En el cultivo de las células del epitelio olfatorio se observan células en distinto estadio de desarrollo, lo que posibilitará el estudio del impacto de la desorganización del citoesqueleto en la fisiología de las células precursoras neuronales así como la repercusión de las alteraciones en las corrientes iónicas en la comunicación de las neuronas maduras. Adicionalmente, este modelo experimental posibilitará la detección de otras disfunciones que permitan establecer un conjunto de signos útiles al realizar un diagnóstico diferencial de las enfermedades neuropsiquiátricas y la detección temprana de los sujetos con alto riesgo de presentar una enfermedad de este tipo.

13. LITERATURA CITADA

Agarwal, N., Rambaldelli, G., Perlini, C., Dusi, N., Kitis, O., Bellani, M., Cerini, R., Isola, M., Versace, A., Balestrieri, M., Gasparini, A., Mucelli, R.P., Tansella, M., Brambilla, P., 2008. Microstructural thalamic changes in schizophrenia: a combined anatomic and diffusion weighted magnetic resonance imaging study. *J Psychiatry Neurosci* 33, 440-448

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, USA. Pp 1350.

Antolin, S., Reisert, J., Matthews, H.R., 2010. Olfactory response termination involves Ca²⁺-ATPase in vertebrate olfactory receptor neuron cilia. *J Gen Physiol* 135, 367-378

Aoki, K., Osumi-Yamashita, N., Ninomiya, Y., Eto, K., 1995. Differential expression of N-CAM, vimentin and MAP1B during initial pathfinding of olfactory receptor neurons in the mouse embryo. *Anat Embryol (Berl)* 192, 211-220.

Arnold, S.E., Han, L.Y., Moberg, P.J., Turetsky, B.I., Gur, R.E., Trojanowski, J.Q., Hahn, C.G., 2001. Dysregulation of olfactory receptor neuron lineage in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 58, 829-835.

Arnold, S.E., Lee, V.M., Gur, R.E., Trojanowski, J.Q., 1991. Abnormal expression of two microtubule-associated proteins (MAP2 and MAP5) in specific subfields of the hippocampal formation in schizophrenia. *Proc Nat Acad Sci USA* 88, 10850–10854.

Asociación Americana de Psiquiatría, 2000. DSM-IV. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Cuarta Edición. Texto Revisado. Washington, DC: American Psychiatric Press; p. 1049.

Attems, J., Alpar, A., Spence, L., McParland, S., Heikenwalder, M., Uhlén, M., Tanila, H., Hökfelt, T.G., Harkany, T., 2012. Clusters of secretagogin-expressing neurons in the aged human olfactory tract lack terminal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 6259-6264.

Baas, P.W., Lin, S., 2011. Hooks and comets: The story of microtubule polarity orientation in the neuron. *Dev Neurobiol* 71, 403-418.

Babu, H., Claasen, J.H., Kannan, S., Rünker, A.E., Palmer, T., Kempermann, G., 2011. A protocol for isolation and enriched monolayer cultivation of neural precursor cells from mouse dentate gyrus. *Front Neurosci* 5, 89.

Baiano, M., Perlini, C., Rambaldelli, G., Cerini, R., Dusi, N., Bellani, M., Spezzapria, G., Versace, A., Balestrieri, M., Mucelli, R.P., Tansella, M., Brambilla, P., 2008. Decreased entorhinal cortex volumes in schizophrenia. *Schizophr Res* 102, 171-180.

Baier, P.C., Koch, J.M., Seeck-Hirschner, M., Ohlmeyer, K., Wilms, S., Aldenhoff, J.B., Hinze-Selch, D., 2009. A flow-cytometric method to investigate glutamate-receptor-sensitivity in whole blood platelets - results from healthy controls and patients with schizophrenia. *J Psychiatr Res* 43, 585-591.

Bean, B.P., 1989. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 51, 367-384.

Belluscio, L., Gold, G.H., Nemes, A., Axel, R., 1998. Mice deficient of Golf are anosmic. *Neuron* 20, 69-81.

Benítez-King, G., 2006. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res* 40, 1-9.

Benítez-King, G., Riquelme, A., Ortíz-López, L., Berlanga, C., Rodríguez-Verdugo, M.S., Romo, F., Calixto, E., Solís-Chagoyán, H., Jiménez, M., Montaña,

L.M., Ramírez-Rodríguez, G., Morales-Mulia, S., Domínguez-Alonso, A., 2011. A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *J Neurosci Methods* 201, 35-45.

Beyl, S., Depil, K., Hohaus, A., Stary-Weinzinger, A., Linder, T., Timin, E., Hering, S., 2012. Neutralisation of a single voltage sensor affects gating determinants in all four pore-forming S6 segments of Ca(V)1.2: a cooperative gating model. *Pflugers Arch* 464, 391-401.

Berghuis, P., Rajnicek, A.M., Morozov, Y.M., Ross, R.A., Mulder, J., Urbán, G.M., Monory, K., Marsicano, G., Matteoli, M., Canty, A., Irving, A.J., Katona, I., Yanagawa, Y., Rakic, P., Lutz, B., Mackie, K., Harkany, T., 2007. Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science* 316, 1212-1216.

Bigos, K.L., Mattay, V.S., Callicott, J.H., Straub, R.E., Vakkalanka, R., Kolachana, B., Hyde, T.M., Lipska, B.K., Kleinman, J.E., Weinberger, D.R., 2010. Genetic variation in CACNA1C affects brain circuitries related to mental illness. *Arch Gen Psychiatry* 67, 939-945.

Blanco-Hernández, E., Valle-Leija, P., Zomosa-Signoret, V., Drucker-Colín, R., Vidaltamayo, R., 2012. Odor memory stability after reinnervation of the olfactory bulb. *PLoS One* 7, e46338.

Bönigk, W., Bradley, J., Müller, F., Sesti, F., Boehhoff, I., Ronnett, G.V., Kaupp, U.B., Frings, S., 1999. The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. *J Neurosci* 19, 5332-5347.

Borgmann-Winter, K.E., Rawson, N.E., Wang, H.Y., Wang, H., Macdonald, M.L., Ozdener, M.H., Yee, K.K., Gomez, G., Xu, J., Bryant, B., Adamek, G., Mirza, N., Pribitkin, E., Hahn, C.G., 2009. Human olfactory epithelial cells generated in vitro express diverse neuronal characteristics. *Neuroscience* 158, 642–653.

Borisy, G.G., Olmsted, J.B., 1972. Nucleated assembly of microtubules in porcine brain extracts. *Science* 177, 1196-1197.

Borisy, G.G., Olmsted, J.B., Klugman, R.A., 1972. In vitro aggregation of cytoplasmic microtubule subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 69, 2890-2894.

Bradley, J., Bonigk, W., Yau, K.W., Frings, S., 2009. Calmodulin permanently associates with rat olfactory CNG channels under native conditions. *Nat Neurosci* 7, 705-710.

Brambilla, P., Perlini, C., Rajagopalan, P., Saharan, P., Rambaldelli, G., Bellani, M., Dusi, N., Cerini, R., Pozzi Mucelli, R., Tansella, M., Thompson, P.M., 2013. Schizophrenia severity, social functioning and hippocampal neuroanatomy: three-dimensional mapping study. *Br J Psychiatry* 202, 50-55.

Brambilla, P., Tansella, M., 2007. The role of white matter for the pathophysiology of schizophrenia. *Int Rev Psychiatry* 19, 459-468.

Brewer, W.J., Wood, S.J., McGorry, P.D., Francey, S.M., Phillips, L.J., Yung, A.R., Anderson, V., Copolov, D.L., Singh, B., Velakoulis, D., Pantelis, C., 2003. Impairment of olfactory identification ability in individuals at ultra-high risk for psychosis who later develop schizophrenia. *Am J Psychiatry* 160, 1790-1794.

Casini, S., Tan, H.L., Demirayak, I., Remme, C.A., Amin, A.S., Scicluna, B.P., Chatyan, H., Ruijter, J.M., Bezzina, C.R., van Ginneken, A.C., Veldkamp, M.W., 2010. Tubulin polymerization modifies cardiac sodium channel expression and gating. *Cardiovasc Res* 85, 691-700.

Cassimeris, L., Spittle, C., 2001. Regulation of microtubule-associated proteins. *Int Rev Cytol* 210, 163-226.

Castillo, K., Restrepo, D., Bacigalupo, J., 2010. Cellular and molecular Ca²⁺ microdomains in olfactory cilia support low signaling amplification of odor transduction. *Eur J Neurosci* 32, 932-938.

Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N.J., Hirokawa N., 1992. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360, 674–677.

Cleveland, D.W., Havercroft, J.C., 1983. Is apparent autoregulatory control of tubulin synthesis nontranscriptionally regulated? *J Cell Biol* 97, 919-924.

Connor, C.M., Crawford, B.C., Akbarian, S., 2011. White matter neuron alterations in schizophrenia and related disorders. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 325-334.

Cotter, D., Kerwin, R., Doshi, B., Martin, C.S., Everall, L.P., 1997. Alterations in hippocampal non-phosphorylated MAP2 protein expression in schizophrenia. *Brain Res* 765, 238–246.

Cygnar, K.D., Zhao, H., 2009. Phosphodiesterase 1C is dispensable for rapid response termination of olfactory sensory neurons. *Nat. Neurosci* 12, 454-462.

Danciger, E., Mettling, C., Vidal, M., Morris, R., Margolis, F., 1989. Olfactory marker protein gene: its structure and olfactory neuron-specific expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 8565-8569.

Daniels, M., 1975. The role of microtubules in the growth and stabilization of nerve fibers. *Ann N Y Acad Sci* 253, 535–544.

Decarolis, N.A., Mechanic, M., Petrik, D., Carlton, A., Ables, J.L., Malhotra, S., Bachoo, R., Götz, M., Lagace, D.C., Eisch, A.J., 2013. In vivo contribution of nestin- and GLAST-lineage cells to adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*. doi: 10.1002/hipo.22130.

Delgado, R., Saavedra, M.V., Schmachtenberg, O., Sierralta, J., Bacigalupo, J., 2003. Presence of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in chemosensory cilia support a role in odor transduction. *J Neurophysiol* 90, 2022-2028.

Dolphin, A.C., 2009. Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr Opin Neurobiol* 19, 237-244.

Dráber, P., Sulimenko, V., Dráberová, E., 2012. Cytoskeleton in mast cell signaling. *Front Immunol* 3, 130.

Dubovsky, S.L., Christiano, J., Daniell, L.C., Franks, R.D., Murphy, J., Adler, L., Baker, N., Harris, R.A., 1989. Increased platelet intracellular calcium concentration in patients with bipolar affective disorders. *Arch Gen Psychiatry* 46, 632-638.

Dubovsky, S.L., Lee, C., Christiano, J., Murphy, J., 1991. Elevated platelet intracellular calcium concentration in bipolar depression. *Biol Psychiatry* 29, 441-450.

Ellison-Wright, I., Bullmore, E., 2010. Anatomy of bipolar disorder and schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res* 117, 1-12.

Emamghoreishi, M., Schlichter, L., Li, P.P., Parikh, S., Sen, J., Kamble, A., Warsh, J.J., 1997. High intracellular calcium concentrations in transformed lymphoblasts from subjects with bipolar I disorder. *Am J Psychiatry* 154, 976-982.

Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W., Catterall, W.A., 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25, 533-535.

Fatt, P., Katz, B., 1953. The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J Physiol* 120, 171-204

Gardner, M.K., Zanic, M., Howard, J., 2013. Microtubule catastrophe and rescue. *Curr Opin Cell Biol* 25, 14-22.

Gautam, S.H., Otsuguro, K., Ito, S., Saito, T., Habara, Y., 2006. Intensity of odorant stimulation affects mode of Ca²⁺ dynamics in rat olfactory receptor neurons. *Neurosci Res* 55, 410-420.

Gautam, S.H., Otsuguro, K.I., Ito, S., Saito, T., Habara, Y., 2007. T-Type Ca²⁺ channels mediate propagation of odor-induced Ca²⁺ transients in rat olfactory receptor neurons. *Neuroscience* 144, 702-713.

Giachino, C., Taylor, V., 2009. Lineage analysis of quiescent regenerative stem cells in the adult brain by genetic labelling reveals spatially restricted neurogenic niches in the olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 30, 9-24.

Gillespie, C.S., Wilson, R., Davidson, A., Brophy, P.J., 1989. Characterization of a cytoskeletal matrix associated with myelin from rat brain. *Biochem J* 260, 689-696.

Glantz, L.A., Lewis, D.A., 2000. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57, 65-73.

Glantz, L.A., Lewis, D.A., 2001. Dendritic spine density in schizophrenia and depression. *Arch Gen Psychiatry* 58, 203.

Gómez Dantés, H., Victoria Castro, M., Franco-Marina, F., Bedregal, P., Rodríguez García, J., Espinoza, A., Valdez Huarcaya, W., Lozano, R., 2011. La carga de la enfermedad en países de América Latina. *Salud Publica Mex* 53, S72-S77.

Gomez, G., Rawson, N.E., Hahn, C.G., Michaels, R., Restrepo, D., 2000. Characteristics of odorant elicited calcium changes in cultured human olfactory neurons. *J Neurosci Res* 62, 737-749.

Gonzalez-Billault, C., Muñoz-Llancao, P., Henriquez, D.R., Wojnacki, J., Conde, C., Caceres, A., 2012. The role of small GTPases in neuronal morphogenesis and polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69, 464-485.

Gonzalez, S., Xu, C., Ramirez, M., Zavala, J., Armas, R., Contreras, S.A., Contreras, J., Dassori, A., Leach, R.J., Flores, D., Jerez, A., Raventós, H., Ontiveros, A., Nicolini, H., Escamilla, M., 2013. Suggestive evidence for association between L-type voltage-gated calcium channel (CACNA1C) gene haplotypes and bipolar disorder in Latinos: a family-based association study. *Bipolar Disord* 15, 206-214.

Gorham, J.D., Ziff, E.B., Baker, H., 1991. Differential spatial and temporal expression of two type III intermediate filament proteins in olfactory receptor neurons. *Neuron* 7, 485-497.

Goswami, C., Kuhn, J., Heppenstall, P.A., Hucho, T., 2010. Importance of non-selective cation channel TRPV4 interaction with cytoskeleton and their reciprocal regulations in cultured cells. *PLoS One* 5, e11654.

Gotow, T., 2000. Neurofilaments in health and disease. *Med Electron Microsc* 33, 173-199.

Govitrapong, P., Mukda, S., Turakitwanakan, W., Dumrongphol, H., Chindaduangratn, C., Sanvarinda, Y., 2002. Platelet serotonin transporter in schizophrenic patients with and without neuroleptic treatment. *Neurochem Int* 41, 209-216.

Green, E.K., Grozeva, D., Jones, I., Jones, L., Kirov, G., Caesar, S., Gordon-Smith, K., Fraser, C., Forty, L., Russell, E., Hamshere, M.L., Moskvina, V., Nikolov, I.,

Farmer, A., McGuffin, P. Wellcome Trust Case Control Consortium, Holmans, P.A., Owen, M.J., O'Donovan, M.C., Craddock, N., 2010. The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 15, 1016-1022.

Gur, R.E., Turetsky, B.I., Bilker, W.B., Gur, R.C., 1999. Reduced gray matter volume in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 56, 905-911.

Gur, R.E., Turetsky, B.I., Cowell, P.E., Finkelman, C., Maany, V., Grossman, R.I., Arnold, S.E., Bilker, W.B., Gur, R.C., 2000. Temporolimbic volume reductions in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57, 769-775.

Hahn, C.G., Gomez, G., Restrepo, D., Friedman, E., Josiassen, R., Pribitkin, E.A., Lowry, L.D., Gallop, R.J., Rawson, N.E., 2005. Aberrant intracellular calcium signaling in olfactory neurons from patients with bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 162, 616-8.

Hahn, C.G., Han, L.Y., Rawson, N.E., Mirza, N., Borgmann-Winter, K., Lenox, R.H., Arnold, S.E., 2005. In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 483, 154-163.

Hagiwara, S., Ozawa, S., Sand, O., 1975. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* 65, 617-644.

Halpain, S., Dehmelt, L., 2006. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7, 224.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 85–100.

Heinze, G., Benítez-King, G., Bauer, J., 1990. Melatonina y depresión. *Salud Mental* 13, 39-44.

Hirokawa, N., 1994. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 74–81.

Hofmann, F., Biel, M., Flockerzi, V., 1994. Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 17, 399-418.

Hough, C., Lu, S.J., Davis, C.L., Chuang, D.M., Post, R.M., 1999. Elevated basal and thapsigargin-stimulated intracellular calcium of platelets and lymphocytes from bipolar affective disorder patients measured by a fluorometric microassay. *Biol Psychiatry* 46, 247-255.

Hyman, A.A., Salser, S., Drechsel, D.N., Unwin, N., Mitchison, T.J., 1992. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell* 3, 1155–1167.

Jafek, B.W., Murrow, B., Michaels, R., Restrepo, D., Linschoten, M., 2002. Biopsies of human olfactory epithelium. *Chem Senses* 27, 623-628.

Johnson, B.D., Byerly, L., 1993. A cytoskeletal mechanism for Ca²⁺ channel metabolic dependence and inactivation by intracellular Ca²⁺. *Neuron* 10, 797-804.

Johnson, B.D., Byerly, L., 1994. Ca²⁺ channel Ca(2+)-dependent inactivation in a mammalian central neuron involves the cytoskeleton. *Pflugers Arch* 429, 14-21.

Jones, L.B., Johnson, N., Byne, W., 2002. Alterations in MAP2 immunocytochemistry in areas 9 and 32 of schizophrenic prefrontal cortex. *Psychiatry Res: Neuroimaging* 114, 137–148.

Katz, W., Weinstein, B., Solomon, F., 1990. Regulation of tubulin levels and microtubule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*: consequences of altered tubulin gene copy number. *Mol Cell Biol* 10, 5286-5294.

Kerssemakers, J.W., Munteanu, E.L., Laan, L., Noetzel, T.L., Janson, M.E., Dogterom, M., 2006. Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature* 442, 709-712.

Kim, M.S., Morii, T., Sun, L.X., Imoto, K., Mori, Y., 1993. Structural determinants of ion selectivity in brain calcium channel. *FEBS Lett* 318, 145–148.

Kohlmeier, K.A., Watanabe, S., Tyler, C.J., Burlet, S., Leonard, C.S., 2008. Dual orexin actions on dorsal raphe and laterodorsal tegmentum neurons: noisy cation current activation and selective enhancement of Ca²⁺ transients mediated by L-type calcium channels. *J Neurophysiol* 100, 2265-2281.

Kolomeets, N.S., Orlovskaya, D.D., Uranova, N.A., 2007. Decreased numerical density of CA3 hippocampal mossy fiber synapses in schizophrenia. *Synapse* 61, 615–621.

Kream, R.M., Margolis, F.L., 1984. Olfactory marker protein: turnover and transport in normal and regenerating neurons. *J Neurosci* 4, 868-879.

Krishna, N.S., Getchell, M.L., Buiakova, O.I., Margolis, F.L., Getchell, T.V., 1995. Human olfactory receptor neurons contain OMP mRNA in their dendritic and axonal processes. *Neuroreport* 6, 817-821.

Krolewski, R.C., Packard, A., Schwob, J.E., 2013. Global expression profiling of globose basal cells and neurogenic progression within the olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 521, 833-859.

Kuo, C.C., Hess, P., 1993. Ion permeation through the L-type Ca²⁺ channel in rat pheochromocytoma cells: two sets of ion binding sites in the pore. *J Physiol* 466, 629–655.

Kurt, S., Sausbier, M., Rüttiger, L., Brandt, N., Moeller, C.K., Kindler, J., Sausbier, U., Zimmermann, U., van Straaten, H., Neuhuber, W., Engel, J., et al.,

2012. Critical role for cochlear hair cell BK channels for coding the temporal structure and dynamic range of auditory information for central auditory processing. *FASEB J* 26, 3834-3843.

Lacinová, L., 2005. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24, 1-78.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Ledesma, M.D., Dotti, C.G., 2003. Membrane and cytoskeleton dynamics during axonal elongation and stabilization. *Int. Rev. Cytol.* 227, 183–219.

Lee, M.K., Cleveland, D.W., 1996. Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 19, 187-217.

Lee, M.K., J.B. Tuttle, L.I. Rebhun, Frankfurter, A., 1990. The expression and posttranslational modification of a neuron-specific β -tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Mot Cytoskel* 17, 118–132.

Lagace, D.C., Whitman, M.C., Noonan, M.A., Ables, J.L., DeCarolis, N.A., Arguello, A.A., Donovan, M.H., Fischer, S.J., Farnbauch, L.A., Beech, R.D., DiLeone, R.J., Greer, C.A., Mandyam, C.D., Eisch, A.J., 2007. Dynamic contribution of nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis. *J Neurosci* 27, 12623-12629.

Leopold, D.A., Hummel, T., Schwob, J.E., Hong, S.C., Knecht, M., Kobal, G., 2000. Anterior distribution of human olfactory mucosa. *Laryngoscope* 110, 417-421.

Liu, Y., Blackwood, D.H., Caesar, S., de Geus, E.J., Farmer, A., Ferreira, M.A., Ferrier, I.N., Fraser, C., Gordon-Smith, K., Green, E.K., Grozeva, D., Gurling, H.M., Hamshere, M.L., Heutink, P., Holmans, P.A., et al., 2011. Meta-analysis of genome-wide association data of bipolar disorder and major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 16, 2-4.

Liu, Y., Staal, J.A., Canty, A.J., Kirkcaldie, M., King, A.E., Bibari, O., Mitew, S.T., Dickson, T.C., Vickers, J.C., 2012. Cytoskeletal changes during development and aging in the cortex of neurofilament light protein knockout mice. *J Comp Neurol* doi: 10.1002/cne.23261.

Llinas, R., Yarom, Y., 1981. Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurons in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J Physiol* 315, 549-567.

Logan, T.T., Villapol, S., Symes, A.J., 2013. TGF- β Superfamily Gene Expression and Induction of the Runx1 Transcription Factor in Adult Neurogenic Regions after Brain Injury. *PLoS One* 8, e59250.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Ma, L.Q., Liu, C., Wang, F., Xie, N., Gu, J., Fu, H., Wang, J.H., Cai, F., Liu, J., Chen, J.G., 2009. Activation of phosphatidylinositol-linked novel D1 dopamine receptors inhibits high-voltage-activated Ca²⁺ currents in primary cultured striatal neurons. *J Neurophysiol* 101, 2230-2238.

Malan, D., Gallo, M.P., Bedendi, I., Biasin, C., Levi, R.C., Alloatti, G., 2003. Microtubules mobility affects the modulation of L-type I(Ca) by muscarinic and beta-adrenergic agonists in guinea-pig cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 35, 195-206.

Margolin, G., Gregoretti, I.V., Cickovski, T.M., Li, C., Shi, W., Alber, M.S., Goodson, H.V., 2012. The mechanisms of microtubule catastrophe and rescue: implications from analysis of a dimer-scale computational model. *Mol Biol Cell* 23, 642-656.

Margolis, F.L., 1982. Olfactory marker protein (OMP). *Scand J Immunol Suppl* 9, 181-199.

McNaughton, N.C., Randall, A.D., 1997. Electrophysiological properties of the human N-type Ca²⁺ channel: I. Channel gating in Ca²⁺, Ba²⁺ and Sr²⁺ containing solutions. *Neuropharmacology* 36, 895-915.

Medina-Mora, M.E, Borges, G., Lara, M.C., Benjet, C., Blanco, J.J., Fleiz, B.C., Villatoro, V.J., Rojas, G.E., Zambrano, R.J., et al., 2003. Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Mental* 26, 1-16.

Meyer, U., Feldon, J., 2010. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol* 90, 285–326.

Mombaerts, P., 1999. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* 286, 707-711.

Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmonson, J., Axel, R., 1996. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87, 675-686.

Montenegro-Venegas, C., Tortosa, E., Rosso, S., Peretti, D., Bollati, F., Bisbal, M., Jausoro, I., Avila, J., Cáceres, A., Gonzalez-Billault, C., 2010. MAP1B regulates axonal development by modulating Rho-GTPase Rac1 activity. *Mol Biol Cell* 21, 3518-3528.

Mori, K., Nagao, H., Yoshihara, Y., 1999. The olfactory bulb: Coding and processing of odor molecule information. *Science* 286, 711-715.

Morrison, E., Costanzo, R., 1990. Morphology of the human olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 297, 1-13.

Mullen, R.J., Buck, C.R., Smith, A.M., 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 116, 201-211.

Murphy, G.J., Darcy, D.P., Isaacson, J.S., 2005. Intraglomerular inhibition: signaling mechanisms of an olfactory microcircuit. *Nat Neurosci* 8, 354-364.

Nguyen, A.D., Shenton, M.E., Levitt, J.J., 2010. Olfactory dysfunction in schizophrenia: A review of neuroanatomy and psychophysiological measurements. *Harv Rev Psychiatry* 18, 279–292.

Nicholls, J.G., Martin, A.R., Wallace, B.G., Fuchs, P.A., 2001. From Neuron to brain. Sinauer Associates, Inc.; Massachusetts, USA. Pp 580.

Olmsted, J.B., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F., Rosenbaum, J., 1970. Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 65, 129-136.

Op De Beeck, L., Verlooy, J.E., Van Buul-Offers, S.C., Du Caju, M.V., 1997. Detection of serum insulin-like growth factor binding proteins on western ligand blots by biotinylated IGF and enhanced chemiluminescence. *J Endocrinol* 154 (2), R1–5.

Organización Mundial de la Salud, 2001. Salud mental: Nuevos conocimientos, nuevas esperanzas. OMS, Ginebra, Suiza. Pp 176.

Pascarel, C., Brette, F., Cazorla, O., le Guennec, J.Y., 1999. Effects on L-type calcium current of agents interfering with the cytoskeleton of isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Exp Physiol* 84, 1043-1050.

Pifferi, S., Pascarella, G., Boccaccio, A., Mazzatenta, A., Gustincich, S., Menini, A., Zucchelli, S., 2006. Bestrophin-2 is a candidate calcium-activated chloride channel involved in olfactory transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 12929-12934.

Pyrski, M., Koo, J.H., Polumuri, S.K., Ruknudin, A.M., Margolis, J.W., Schulze, D.H., Margolis, F.L., 2007. Sodium/calcium exchanger expression in the mouse and rat olfactory systems. *J Comp Neurol* 501, 944-958.

Randall, A., Tsien, R.W., 1995. Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15, 2995-3012.

Rane, S.G., Holz, G.G. 4th, Dunlap, K., 1987. Dihydropyridine inhibition of neuronal calcium current and substance P release. *Pflugers Arch* 409, 361-366.

Ransome, M.I., Hannan, A.J., 2013. Impaired basal and running-induced hippocampal neurogenesis coincides with reduced Akt signaling in adult R6/1 HD mice. *Mol Cell Neurosci* 54C, 93-107.

Rawson, N.E., Gomez, G., Cowart, B., Brand, J.G., Lowry, L.D., Pribitkin, E.A., Restrepo, D., 1997. Selectivity and response characteristics of human olfactory neurons. *J Neurophysiol* 77, 1606-1613.

Rawson, N.E., Ozdener, M.H., 2013. Primary culture of the human olfactory neuroepithelium. *Methods Mol Biol* 945, 81-93.

Restrepo, D., 2005. The ins and outs of intracellular chloride in olfactory receptor neurons. *Neuron* 45, 481-482.

Rioux, L., Ruscheinsky, D., Arnold, S.E., 2004. Microtubule-associated protein MAP2 expression in olfactory bulb in schizophrenia. *Psychiatry Res* 128, 1-7.

Roisen, F.J., Klueber, K.M., Lu, C.L., Hatcher, L.M., Dozier, A., Shields, C.B., Maguire, S., 2001. Adult human olfactory stem cells. *Brain Res* 890, 11-22.

Rogers, K.E., Dasgupta, P., Gubler, U., Grillo, M., Khew-Goodall, Y.S., Margolis, F.L., 1987. Molecular cloning and sequencing of a cDNA for olfactory marker protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 1704-1708.

Rosoklija, G., Toomayan, G., Ellis, S.P., Keilp, J.G., Mann, J.J., Latov, N., Hays, A.P., Dwork, A.J., 2000. Structural abnormalities of subicular dendrites in subjects with schizophrenia and mood disorders: preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry* 57, 349-356.

Rupp, C. I., 2010. Olfactory function and schizophrenia: an update. *Curr Opin Psychiatry* 23, 97–102.

Sawa, A., Cascella, N.G., 2009. Peripheral olfactory system for clinical and basic psychiatry: a promising entry point to the mystery of brain mechanism and biomarker identification in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 166, 137–139.

Schild, D., Restrepo, D., 1998. Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol Rev* 78, 429-466.

Schwob, J.E., Farber, N.B., Gottlieb, D.I., 1986. Neurons of the olfactory epithelium in adult rats contain vimentin. *J Neurosci* 6, 208-217.

Shenton, M.E., Dickey, C.C., Frumin, M., McCarley, R.W., 2001. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res* 49, 1–52.

Shiraiwa, T., Makoto, Kashiwayanagi, M., Iijima, T., Murakami, M., 2007. Involvement of the calcium channel Beta-3 subunit in olfactory signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 355, 1019-1024.

Singh, A.N., Barlas, C., Saeedi, H., Mishra, R.K., 2003. Effect of loxapine on peripheral dopamine-like and serotonin receptors in patients with schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci* 28, 39-47.

Stephana, A.B., Shuma, E.Y., Hirsha, S., Cygnara, K.D., Reiserb, J., Zhaoa, H., 2009. ANO2 is the cilia calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 11776-11781.

Subramanian, R., Kapoor, T.M., 2012. Building complexity: insights into self-organized assembly of microtubule-based architectures. *Dev Cell* 23, 874-885.

Suzuki, J., Yoshizaki, K., Kobayashi, T., Osumi, N., 2013. Neural crest-derived horizontal basal cells as tissue stem cells in the adult olfactory epithelium. *Neurosci Res* 75, 112-120.

Tajinda, K., Ishizuka, K., Colantuoni, C., Morita, M., Winicki, J., Le, C., Lin, S., Schretlen, D., Sawa, A., Cascella, N.G., 2010. Neuronal biomarkers from patients with mental illnesses: a novel method through nasal biopsy combined with laser-captured microdissection. *Mol Psychiatry* 15, 231–232.

Takahashi, T., Wood, S.J., Yung, A.R., Phillips, L.J., Soulsby, B., McGorry, P.D., Tanino, R., Zhou, S.Y., Susuki, M., Velakouli, D., Pantelis, C., 2009. Insular cortex gray matter changes in individuals at ultra-high risk of developing psychosis. *Schizophr Res* 111, 94-102.

Teng, J., Takei, Y., Harada, A., Nakata, T., Chen, J., Hirokawa, N., 2001. Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J Cell Biol* 155, 65-76.

Theocharatos, S., Wilkinson, D.J., Darling, S., Wilm, B., Kenny, S.E., Edgar, D., 2013. Regulation of progenitor cell proliferation and neuronal differentiation in enteric nervous system neurospheres. *PLoS One* 8, e54809.

Turetsky, B., Cowell, P.E., Gur, R.C., Grossman, R.I., Shtasel, D.L., Gur, R.E., 1995. Frontal and temporal lobe brain volumes in schizophrenia. Relationship to symptoms and clinical subtype. *Arch Gen Psychiatry* 52, 1061–1070.

Turetsky, B.I., Hahn, C.G., Arnold, S.E., Moberg, P.J., 2009a. Olfactory receptor neuron dysfunction in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 34, 767-774.

Turetsky, B.I., Hahn, C.G., Borgmann-Winter, K., Moberg, P.J., 2009b. Scents and nonsense: Olfactory dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull* 35, 1117-1131.

Turetsky, B.I., Moberg, P.J., 2009c. An odor-specific threshold deficit implicates abnormal intracellular cyclic AMP signaling in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 166, 226-233.

Turetsky, B.I., Moberg, P.J., Owzar, K., Johnson, S.C., Doty, R.L., Gur, R.E., 2003a. Physiologic impairment of olfactory stimulus processing in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 53, 403-411.

Turetsky, B.I., Moberg, P.J., Roalf, D.R., Arnold, S.E., Gur, R.E., 2003b. Decrements in volume of anterior ventromedial temporal lobe and olfactory dysfunction in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 60, 1193-1200.

Turetsky, B.I., Moberg, P.J., Yousem, D., Arnold, S.E., Doty, R.L., Gur, R.E., 2000. Olfactory bulb volume is reduced in patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157, 828–830.

Van Petegem, F., Clark, K.A., Chatelain, F.C., Minor, D.L. Jr., 2004. Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* 429, 671-675.

Vassar, R., Ngai, J., Axel, R., 1993. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* 74, 309-318.

Vignaud, T., Blanchoin, L., Théry, M., 2012. Directed cytoskeleton self-organization. *Trends Cell Biol* 22, 671-682.

Wang, J.Z., Liu, F., 2008. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol* 85, 148-175.

Wakamori, M., Strobeck, M., Niidome, T., Teramoto, T., Imoto, K., Mori, Y., 1998. Functional characterization of ion permeation pathway in the N-type Ca²⁺ channel. *J Neurophysiol* 79, 622-634.

Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W., 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 1858-1862.

White, T., Kendi, A.T., Lehericy, S., Kendi, M., Karatekin, C., Guimaraes, A., Davenport, N., Schulz, S.C., Lim, K.O., 2007. Disruption of hippocampal connectivity in children and adolescents with schizophrenia--a voxel-based diffusion tensor imaging study. *Schizophr Res* 90, 302-307.

Wood, S.J., Kennedy, D., Phillips, L.J., Seal, M.L., Yucel, M., Nelson, B., Yung, A.R., Jackson, G., McGorry, P.D., Velakoulis, D., Pantelis, C., 2010. Hippocampal pathology in individuals at ultra-high risk for psychosis: a multi-modal magnetic resonance study. *Neuroimage* 52, 62-68.

Yang, J., Ellinor, P.T., Sather, W.A., Zhang, J.F., Tsien, R.W., 1993. Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels. *Nature* 366, 158–161.

Zatorre, R.J., Fields, R.D., Johansen-Berg, H., 2012. Plasticity in gray and white: neuroimaging changes in brain structure during learning. *Nat Neurosci* 15, 528-536.

Zhang, X., Klueber, K.M., Guo, Z., Lu, C., Roisen, F.J., 2004. Adult human olfactory neural progenitors cultured in defined medium. *Exp Neurol* 186, 112-123.

Zhang, X., Klueber, K.M., Guo, Z., Cai, J., Lu, C., Winstead, W.I., Qiu, M., Roisen, F.J., 2006. Induction of neuronal differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors. *Brain Res* 1073-1074, 109-119.

Zhang, Y., 2011. Growth and shortening of microtubules: a two-state model approach. *J Biol Chem* 286, 39439-39449.