

## MODULACIÓN SEROTONINÉRGICA DE LA ACTIVIDAD NEURONAL DEL BULBO OLFATORIO DE LA RATA

GABRIEL GARCÍA-HUIDOBRO LLORT<sup>1</sup>, DRA. MARIA DE LA LUZ AYLWIN OSTALÉ<sup>2</sup>.

### RESUMEN

El bulbo olfatorio principal (BO) es la primera estructura de procesamiento de la vía olfatoria y recibe importantes proyecciones centrifugas provenientes del cerebro basal anterior. Dentro de estas proyecciones la vía centrifuga serotoninérgica, originada en los núcleos del rafe, cumple un rol fundamental en la modulación de procesos de aprendizaje y de discriminación olfatoria. En este estudio, caracterizamos la respuesta de neuronas Mitrals/Penacho (M/P) a la superfusión de serotonina (5-HT) 100mM usando la técnica de *patch clamp* en rebanadas de BO de ratas. La frecuencia de descarga neuronal (FDN) fue determinada en condiciones basales y en presencia de 5-HT en registros extracelulares e intracelulares. Nuestros resultados muestran la presencia de dos poblaciones neuronales distintas que respondieron en forma opuesta al neurotransmisor. En los registros extracelulares, 11 células de un total de 23 aumentaron en forma estadísticamente significativa la FDN respecto del nivel basal ( $p=0,0013$ ; prueba t) y las restantes 12 células disminuyeron su FDN ( $p=0,00005$ ). En los registros intracelulares encontramos un efecto similar donde 16 de 29 células aumentaron su FDN ( $p=0,0005$ ), mientras que las 13 restantes mostraron una disminución de ésta ( $p=0,0002$ ). Estos resultados sugieren que 5-HT podría activar diferencialmente receptores de tipo excitatorios o inhibitorios expresados en distintas poblaciones de células M/P con el consecuente efecto excitatorio o inhibitorio en estas células. Como explicación alternativa, debemos considerar la activación de receptores serotoninérgicos expresados en interneuronas del BO que modulan en ultima instancia una inhibición sobre las neuronas M/P. 15 de Julio de 2005. Proyecto Fondecyt N°1000901

**Palabras Claves:** bulbo olfatorio, serotonina, neuronas M/P

### INTRODUCCIÓN

La función olfatoria cumple un rol fundamental en la gran mayoría de los organismos vivos. En vertebrados superiores el olfato es empleado en conductas de apareamiento, búsqueda de alimento, marcaje de territorio, identificación de individuos, etc. (1), así como en respuestas conductuales más complejas, como lo es el aprendizaje (2).

En la actualidad, la mayoría de los estudios publicados acerca de la función, conectividad neuronal y procesamiento de las señales olfatorias han considerado casi exclusivamente la transferencia unidireccional de la actividad sensorial, sin embargo, existen etapas intermedias de procesamiento de estas señales. De hecho, en el bulbo olfatorio (BO), (considerado la primera estación de relevo de la información olfatoria), existe una compleja red de interneuronas que reciben importantes proyecciones de vías "descendentes" o centrifugas provenientes de diferentes regiones del Sistema Nervioso Central (SNC). Estas son: la vía serotoninérgica, proveniente de los núcleos del rafe; la vía noradrenérgica, proveniente del locus coeruleus y una vía colinérgica, proveniente del cerebro basal anterior (3). Se ha postulado que estas vías centrifugas funcionarían como un "interruptor" del paso de las señales olfatorias a los centros olfatorios superiores (4). La evidencia experimental sugiere

que las vías centrifugas participarían activamente en los procesos de discriminación olfatoria, aprendizaje y plasticidad de las respuestas a odorantes. No obstante la relevancia que tienen estas vías en la percepción que se genera a nivel del SNC, los mecanismos que subyacen a su acción son, en su mayoría, desconocidos (2, 3).

Con respecto a la vía serotoninérgica, estudios conductuales han demostrado una clara evidencia de su relevancia en la modulación de señales olfatorias, específicamente aquellas relacionadas con el aprendizaje y la discriminación olfatoria (2, 6, 7). Pese a esto, existe poca información sobre algunos aspectos funcionales y moduladores de esta vía, siendo la menos estudiada de las tres.

Para determinar la acción de la serotonina (5-HT) en los distintos tipos celulares del BO de la rata, se requiere de la caracterización de los efectos serotoninérgicos tanto a nivel de la excitabilidad neuronal, como a nivel de la transmisión sináptica entre las neuronas del BO.

Este estudio pretende determinar los principales efectos de la 5-HT sobre una población celular del BO de ratas, y postular un mecanismo de acción que explique cómo este neurotransmisor modularía la respuesta olfatoria a través de

<sup>1</sup> Estudiante 4° año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

la alteración de la excitabilidad neuronal de dichas células, todo dentro de un contexto de circuito neuronal interconectado, que constituye el BO.

Para tales efectos estudiamos, mediante la técnica *Patch Clamp* en rebanadas de BO de rata, la frecuencia de potenciales de acción o frecuencia de descarga neuronal (FDN) en ausencia y presencia de 5-HT mediante dos modalidades de registro, un modo extracelular y otro modo intracelular.

Los estudios planteados en este proyecto y sus resultados buscan contribuir, en particular, a entender algunos de los mecanismos de acción moduladora que tendría la vía centrífuga serotoninérgica en la dinámica de la actividad neuronal del BO de la rata, para así comprender más profundamente los cambios que ocurren a este nivel de procesamiento de la señal olfatoria. Esto contribuiría a entender de mejor manera la generación de los fenómenos perceptuales, de codificación, discriminación y aprendizaje de conductas iniciadas por estimulación olfatoria.

#### HIPOTESIS

Proponemos que 5-HT tiene efectos opuestos de tipo excitatorio y/o inhibitorio sobre las neuronas mitrales y en penacho (M/P) del BO, dependiendo de los tipos de receptores que allí se encuentren y de la predominancia de determinadas poblaciones de estos en las células del BO.

#### OBJETIVO GENERAL:

Estudiar los efectos de la 5-HT sobre la actividad de las neuronas del BO in situ, que tienen relevancia en la modulación y el procesamiento de las señales olfatorias.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Determinar la respuesta (FDN) de las neuronas mitrales y en penacho presentes en el BO durante la perfusión de 5-HT, en experimentos de registro de actividad extracelular, en la modalidad de fijación de voltaje (*V-Clamp*) y en experimentos de registro intracelular, en modalidad de fijación de corriente (*I-Clamp*).

### MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología que se utilizó para examinar los efectos de la vía centrífuga serotoninérgica en la actividad electrofisiológica de las neuronas del BO, fue la técnica de *patch clamp* en rebanadas de BO de rata, asociada a un sistema de visualización de tejido, consistente en una combinación de luz infrarroja y videomicroscopía de contraste diferencial de interferencia u óptica Nomarski (Differential Interference Contrast, DIC-Nomarski).

#### ANIMALES

En todos los experimentos se utilizaron ratas juveniles, Sprague-Dawley, machos, de entre 3 a 5 semanas de edad, obtenidas del bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

#### EQUIPOS y MONTAJE

-Montaje: Se utilizó un Microscopio Nikon modelo eclipse E 600 de platina fija, no invertido, dotado de un objetivo de alta ampliación (40X de inmersión en agua) y óptica Nomarski. Se utilizó un Micromanipulador que permitió movimientos verticales y horizontales

en rangos de unos pocos micrómetros. La rebanada se fijó en una cámara de registro continuamente perfundida con líquido cerebro espinal artificial (LCEA) oxigenado a un flujo de 2 - 3 ml/minuto.

-Equipos de Amplificación: Se utilizó un Preamplificador (Axon Instrument) con una ganancia de X 1/100. Conectado directamente al electrodo. Un Amplificador (Axopatch 1 D de Axon Instrument) con ganancia de 0.5 a 100 X. Cámara de Video DAGE-DMI.

-Dispositivos de registro: Osciloscopio, PC compatible con tarjeta analógico-digital, Software pClamp5 y pClamp6. (Axon Instruments).

-Sistema de perfusión: La 5-HT y las soluciones fueron aplicadas a las rebanadas por un sistema de perfusión por gravedad, consistente en tubos graduados, bajadas de suero y llaves de tres pasos que conflúan a la cámara de registro.

-Electrodos: Micropipetas de vidrio borosilicato; *Puller* o estirador de micropipetas (Sutter instrument) generando electrodos de aproximadamente 1 mm de diámetro en la punta y con resistencias del orden de entre los 3 a 10 MW.

#### SOLUCIONES

-Solución Extracelular: Se utilizó fluido cerebro espinal artificial (FCEA). La composición de este fluido fue (en mM): 125 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub> y 10 Glucosa (8). Para ajustar el pH entre 7 - 7,5, se mantuvo la solución en burbujeo continuo con una mezcla de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, a concentraciones de 95% y 5% respectivamente.

-Solución Intracelular: Esta solución contiene un buffer de pH (10 mM HEPES, ajustado a pH 7,4), un buffer de Calcio (1.1 mM EGTA), Mg-ATP para mantener las ATPasas activas (3mM), y Na-GTP para procesos que involucren proteínas G (0.3 mM). Para el modo de fijación de corriente (*I-clamp*): se utilizó una solución intracelular de KCl que contiene, además de los buffers nombrados, los siguientes componentes (en mM): 140 KCl, 5 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, y 0.1 CaCl<sub>2</sub>.

#### REBANADAS DE BO DE RATA

Para su obtención, las ratas fueron sacrificadas por decapitación mediante el uso de guillotina. Inmediatamente después se realizó la craneotomía, se quitaron las meninges y se eliminó el encéfalo con el fin de exponer los bulbos olfatorios en el piso de la fosa craneal anterior.

Luego, ambos BO fueron extirpados cuidadosamente y sumergidos en una placa petri con FCEA, la cual fue oxigenada mediante un tubo que contenía una mezcla de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en la proporción ya descrita. Cada BO fue adherido a un bloque de agarosa 2%, con el fin de situarlo en una cámara de corte, en un vibrátomo, y determinar su plano de sección. Las rebanadas fueron de aproximadamente 300 µm de espesor. Finalmente, las rebanadas así obtenidas se incubaron por 45 - 60 minutos a 35°C, para su recuperación, previa a la experimentación.

#### DISEÑO EXPERIMENTAL

Los registros de la actividad eléctrica se realizaron en dos configuraciones; 1) configuración de registro extracelular (*cell-attached*) en fijación de voltaje (*V-clamp*) y; 2) configuración de registro intracelular (*whole-cell*) en fijación de corriente (*I-clamp*).

En ambas configuraciones se registró la frecuencia de descarga neuronal (FDN) en: 1) Condición basal de la neurona en un periodo de tiempo fijo para todos los experimentos de 40 segundos; 2) durante la aplicación de 5-HT (40 seg.) y; 3) en la recuperación o lavado con FCEA (40 seg.).

Se midió la modificación de la FDN, medida en Hz, comparándola con la actividad basal como control. La recuperación o lavado se tomó como un criterio de validación del experimento.

Tanto las células mitrales como las neuronas en penacho fueron identificadas sobre la base de su morfología y ubicación en las distintas capas existentes en el BO (1) (Figura 1).

#### ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos se analizaron usando el software pClamp6. El conteo de las espigas se realizó a través de la exportación de los

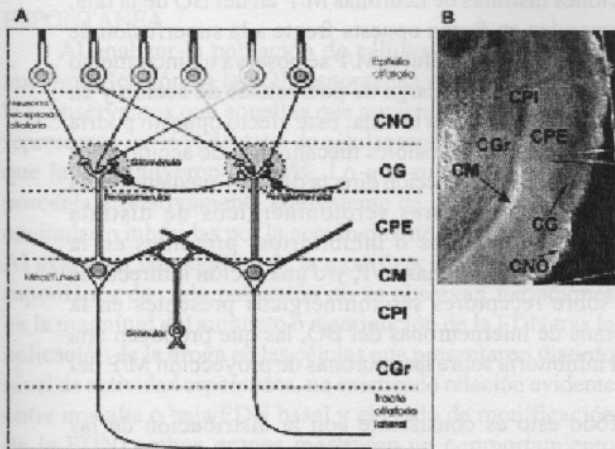


datos a un archivo de texto para después someterlo a un programa de conteo de espigas descrito en *Visual Basic* de aplicaciones (VBA) en plataforma excel.

Se obtuvieron promedios de frecuencia de descargas en cada caso, los que fueron comparados frente a la actividad basal de la misma neurona que se registró en ese momento.

Para el análisis comparativo de los valores promedio de las FDN en las diferentes condiciones experimentales, se utilizó la prueba *t de student* de una cola para variables asociadas, otorgando un nivel de confianza de 95% y considerando como alta significación estadística una  $p < 0,001$ .

**Figura 1.** Estructura del BO.



**A:** Esquema que ilustra las capas del BO y sus principales tipos neuronales. **B:** Fotografía de microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC-Nomarski) con iluminación infrarroja de una rebanada de BO de aproximadamente 300 micrometros de grosor, en la que se indican las capas del BO: CNO: capa del nervio olfatorio; CG: capa glomerular; CPE: capa plexiforme externa; CM: capa mitral; CPI: capa plexiforme interna; CGr: capa glomerular interna.

## RESULTADOS

### CARACTERIZACIÓN CELULAR NÚMERO y UBICACIÓN

Durante el curso de este estudio los registros, tanto extracelulares como intracelulares, se llevaron a cabo en un total de 272 células del tipo mitral o penacho (M/P), identificadas en base a su morfología y ubicación (1, 3, 9). De las 272 células sólo 52 registros fueron exitosos, lo que representa una tasa de éxito cercana al 19%.

Los criterios de éxito fueron los siguientes:

- Obtención de sellos con una resistencia igual o mayor a un GigaOhm (GOhm).
- Estabilidad del registro durante todo el experimento.
- Recuperación de la actividad basal de las neuronas tras la superfusión con FCEA.

Las neuronas registradas, se localizaron principalmente en la Capa Mitral (CM) y Capa Plexiforme Externa (CPE).

### FORMA Y TAMAÑO

Se observó una diversidad morfológica caracterizada por el predominio de células con aspecto piriforme. Los porcentajes obtenidos son: Piriformes (57%); Piramidales (10%); Redondas (10%) y sin forma definida (23%).

El diámetro promedio del soma neuronal fue de  $20,75 \text{ mm} \pm 4,79$  (promedio  $\pm$  desviación estándar). El rango de tamaño de las neuronas registradas varió entre los 8,75 a los 30,62 mm de largo ( $20,75 \pm 4,79 \text{ mm}$ ) y los 8,75 a los 13,12 mm de ancho ( $13,69 \pm 4,34 \text{ mm}$ ).

### ACTIVIDAD BASAL ESPONTÁNEA

La frecuencia de descarga basal medida en Hz (espigas por segundo) varió desde los 0 Hz hasta los 5,025 Hz ( $n=52$ ). Mientras que las restantes 11 neuronas (registros extracelulares), incrementaron su FDN promedio desde  $1,85 \pm 1,33 \text{ Hz}$  (rango de 0 a 4,675 Hz) en condición basal, hasta  $8,89 \pm 6,49 \text{ Hz}$  (rango de 2,1 a 22,75 Hz) en presencia de 5-HT.

Ambos efectos sobre la FDN promedio son estadísticamente significativos por la prueba *t de student* para variables asociadas ( $p < 0,001$ , Figura 2).

### DISMINUCIÓN DE LA FDN EN UN GRUPO DE NEURONAS M/P EN PRESENCIA DE 5-HT

Un total de 28 neuronas disminuyeron su FDN tras la aplicación de 5-HT, correspondientes al 53,85% del total de células exitosamente registradas. De estas, obtuvimos 16 células en experimentos intracelulares y 12 células en experimentos extracelulares.

En los registros intracelulares las frecuencias promedio variaron de  $1,6 \pm 1,37 \text{ Hz}$  (rango de 0,05 a 5,025 Hz) en condición basal, hasta  $0,3 \pm 0,7 \text{ Hz}$  (rango de 0 a 2,37 Hz) en presencia de 5-HT. Mientras que en los registros extracelulares estas frecuencias promedio disminuyeron desde  $2,08 \pm 1,24 \text{ Hz}$  (rango de 0,6 a 4,68 Hz) en condición basal, hasta  $0,96 \pm 0,8 \text{ Hz}$  (rango de 0,2 a 2,45 Hz) en presencia de 5-HT. Ambas disminuciones en la FDN promedio arrojaron una alta significancia estadística por prueba *t de student* para variables asociadas ( $p < 0,001$ , Figura 3).

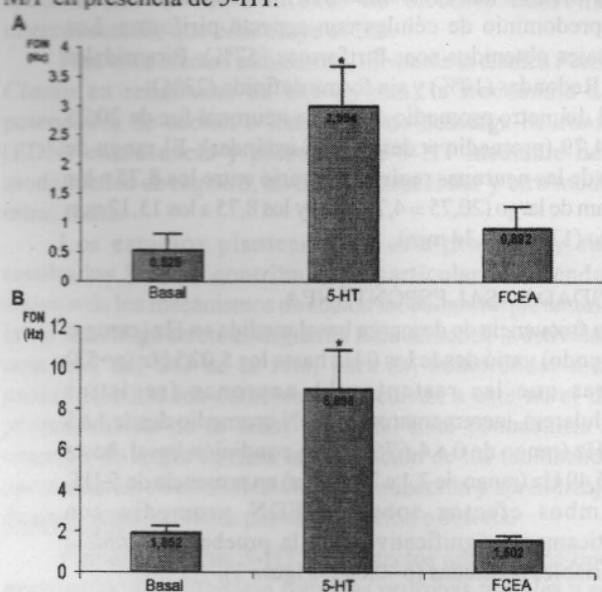
## DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue establecer la acción de la 5-HT, el neurotransmisor de la vía centrifuga serotoninérgica sobre la excitabilidad de las neuronas M/P del BO de la rata.

Mediante el registro electrofisiológico de las acciones de la 5-HT en una preparación *in vitro*, como son las rebanadas de BO de rata, pudimos determinar las acciones de este neurotransmisor en la FDN de éstas células.

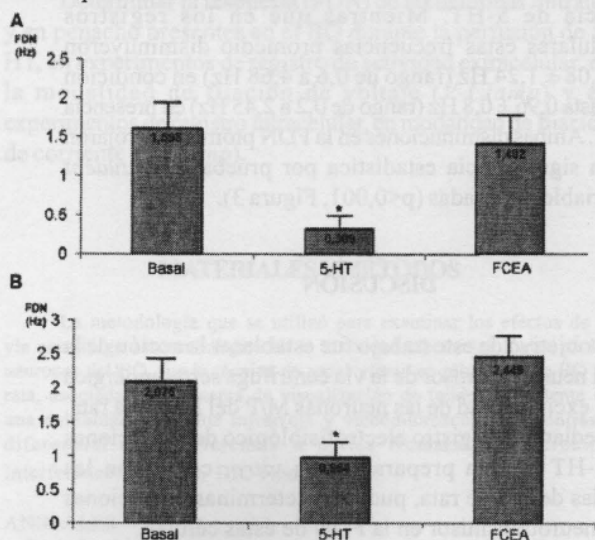
Los registros considerados para el análisis estadístico corresponden sólo a aquellos que cumplieron con los criterios de "registros exitosos" consistentes en una resistencia del sello igual o mayor a 1 GigaOhm, sellos estables durante el registro y recuperación de la actividad basal tras el lavado con FCEA. Hay que considerar que de los 272 registros totales realizados sólo 52 cumplieron con

**Figura 2.** Aumento de la FDN en un Grupo de Neuronas M/P en presencia de 5-HT.



**A**, modalidad de registro intracelular; y **B**, extracelular. En la abscisa se muestran las tres condiciones experimentales: BASAL; 5-HT 100mM; y FCEA. En la ordenada se muestra la FDN promedio en espigas/segundo (Hz). Los valores se presentan como promedios y la barra corresponde al error estándar. \*  $p < 0,001$ .

**Figura 3.** Disminución de la FDN en un Grupo de Neuronas M/P en presencia de 5-HT.



**A**, modalidad de registro intracelular; y **B**, extracelular. En la abscisa se muestran las tres condiciones experimentales: BASAL; 5-HT 100mM; y FCEA. En la ordenada se muestra la FDN promedio en espigas/segundo (Hz). Los valores se presentan como promedios y la barra corresponde al error estándar. \*  $p < 0,001$ .

estas condiciones, arrojando una tasa de éxito cercana al 19%, todo el resto corresponde a experimentos en donde las neuronas no poseían un potencial de membrana (Vm) estable o por artefactos mecánicos o al intentar registrar intracelularmente se perdía el sello entre el electrodo y la membrana. Esta tasa de rendimiento no incluye los intentos fallidos por lograr inicialmente un sello, aumentando en mayor medida la tasa de “fracasos”, lo que sugiere que esta es una técnica muy versátil y sofisticada, pero de bajo rendimiento.

Con esta técnica demostramos la presencia de dos poblaciones distintas de neuronas M/P en del BO de la rata, que responden en forma opuesta frente a la superfusión de 5-HT. En un grupo de células M/P se observa un incremento en la frecuencia de descarga de potenciales de acción y en otro un decremento de la misma. Este efecto opuesto podría ser explicado por dos posibles mecanismos de acción de la 5-HT sobre el BO: una acción directa de 5-HT mediada por la activación de receptores serotoninérgicos de distinta naturaleza (excitatorios o inhibitorios) presentes en la membrana de las neuronas M/P, y/o una acción indirecta de 5-HT sobre receptores serotoninérgicos presentes en la membrana de interneuronas del BO, las que producen una acción inhibitoria sobre las neuronas de proyección M/P del BO.

Todo esto es consistente con la distribución de las fibras serotoninérgicas en el BO, el tipo, ubicación y fisiología de receptores serotoninérgicos y con la organización morfofuncional del circuito neuronal del BO. (1, 3, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16).

#### LOCALIZACIÓN, FORMA Y TAMAÑO DE NEURONAS M/P

Tanto la localización como las características morfológicas utilizadas para identificar las células M/P, fueron consistentes con clasificaciones morfológicas previas (1, 3, 9). Las células mitrales tienen sus cuerpos celulares ubicados principalmente en la CM, existiendo también algunos en la CPE, denominándose células mitrales desplazadas. Las células en penacho, en cambio, se ubican solamente en la CPE (1). Las células registradas en este estudio fueron principalmente mitrales, ya que preferentemente se registraron neuronas ubicadas en la CM, pero en algunos casos también se registraron células de la CPE, correspondientes a células mitrales desplazadas o en penacho. La metodología utilizada en este estudio no permitió distinguir entre células mitrales o en penacho, por lo tanto, ambas fueron consideradas como una sola población de células M/P.

En cuanto a la forma de estas neuronas, la mayoría de los estudios morfológicos en tejidos teñidos las definen como células con forma piramidal (1, 9). En este trabajo encontramos un 10% de neuronas con una forma notoriamente piramidal y un 57% de las células con una morfología piriforme, que claramente corresponden al tipo de células mitrales o en penacho. Esta diferencia puede deberse a que la descripción morfológica fue hecha con preparaciones de tejido fijado y no de tejido vivo.



Respecto al tamaño del soma neuronal, encontramos que el diámetro promedio de las neuronas M/P fue de  $20,75 \pm 4,79$  mm, similar al de estudios previos realizados en cortes de tejido fijado, en que las células mitrales de mamíferos presentaron un cuerpo neuronal de entre 15-30 mm de diámetro y las células en penacho un soma de entre 15-20 mm de diámetro (1). Por lo tanto, concluimos que los factores morfológicos de forma, tamaño y localización de las células registradas en este estudio se corresponden a las de las células M/P del BO de rata.

#### ANÁLISIS DEL EFECTO DE 5-HT SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA

Al analizar la población de células que sí mostraron una modificación de la FDN espontánea en presencia de 5-HT, observamos que aquellas que aumentaron su actividad representan un 46% del total de células registradas y aquellas que la disminuyeron un 54%. Lo que sugiere que hay un porcentaje relativamente equivalente de neuronas que son excitadas o inhibidas por la acción de este neurotransmisor. Al examinar la magnitud de la modificación en la descarga espontánea de cada población no se observan variaciones en la magnitud del aumento o disminución de la FDN tras la aplicación de la droga en las células que presentaron distinto nivel de actividad espontánea, no existiendo relación evidente entre una alta o baja FDN basal y el grado de modificación de la FDN; ambos grupos mostraron un comportamiento independiente de excitación o inhibición frente a la aplicación de 5-HT. Sin embargo, algunas células mostraron un efecto de 5-HT marcado, mientras que otras variaron su frecuencia de descarga en forma más leve. No obstante, estos valores no resultaron ser estadísticamente significativos ( $p=0,0378$ ; prueba t,  $n=24$ ).

De la misma manera, la disminución en la FDN promedio tras la aplicación de 5-HT fue de  $3,65 \pm 1,5$  veces el valor basal. Se aprecia nuevamente una disminución más marcada de la frecuencia de disparos en los registros intracelulares (5,15 veces el valor de la basal) que en aquellos extracelulares (2,15 veces el valor de la basal), pero ahora de manera estadísticamente significativa ( $p=0,0003$ ; prueba t,  $n=29$ ). Esta diferencia probablemente se deba a un efecto producido por el tipo de registro intracelular, en donde se lavan y pierden factores citosólicos claves como segundos mensajeros posiblemente involucrados en la transducción de señales gatilladas por 5-HT, a diferencia de los experimentos extracelulares en que el medio intracelular permanece intacto.

#### EL EFECTO DE 5-HT ES COMPLETAMENTE REVERSIBLE

En las células que sufrieron una modificación de su FDN espontánea posterior a la aplicación de 5-HT se observó una recuperación de la misma después de un período de superfusión con FCEA de aproximadamente 2,5 a 5 minutos. Los valores promedio de las FDN basal versus aquellos de lavado con FCEA de los distintos grupos neuronales no mostraron diferencias estadísticamente significativas a la prueba t de Student ( $p=0,261$ ,  $n=52$ ). Solo en un experimento extracelular y en uno intracelular no se logró la recuperación

total de la célula dentro de ese tiempo, excluyéndose del estudio. Estos resultados permiten concluir que el efecto de 5-HT es totalmente reversible.

#### POSIBLES EXPLICACIONES DE LOS EFECTOS OPUESTOS DE 5-HT SOBRE LA EXCITABILIDAD DE LAS CELULAS M/P.

Nuestros resultados nos permiten deducir la presencia de dos tipos neuronales de distribución y morfología similar, que responden en forma opuesta a la aplicación de 5-HT. Estos resultados pueden deberse a una acción directa de 5-HT mediada por la activación de receptores serotoninérgicos excitatorios o inhibitorios presentes en las neuronas M/P y/o a una acción indirecta de 5-HT sobre receptores serotoninérgicos presentes en interneuronas (IN) periglomerulares o granulares del BO, las que a su vez, producen una acción inhibitoria sobre la FDN de las neuronas de proyección M/P del BO. De esta manera, la 5-HT generaría últimamente una inhibición en estas neuronas o bien una inhibición de esta inhibición y por lo tanto una excitación final.

La preponderancia de estos efectos directos o indirectos dependerá de la predominancia diferencial de receptores de 5-HT en una u otra población celular.

La evidencia previa de la activación de receptores de 5-HT en células del BO es prácticamente nula, el único estudio disponible de la acción de 5-HT consistió en un experimento realizado en ratas anestesiadas, en donde se inyectó mediante iontoforesis 5-HT en el BO, demostrándose una acción inhibitoria sobre la descarga espontánea de las células mitrales (17).

En el BO se han descrito 4 tipos de receptores serotoninérgicos diferentes: 5-HT<sub>1A</sub> (11), 5-HT<sub>2A/2C</sub> (12) y 5-HT<sub>3</sub> (13) distribuidos preferentemente en la CG y CGr. Sin embargo, las consecuencias de su activación en el BO no han sido determinadas. Estudios electrofisiológicos y bioquímicos en otras regiones del encéfalo han caracterizado la respuesta neuronal de la activación diferencial de estos receptores (10, 18, 19). Así, la consecuencia de esta activación sería excitatoria (5-HT<sub>3</sub>), inhibitoria (5-HT<sub>1A</sub>) o ambas (5-HT<sub>2A/2C</sub>), dependiendo de la ruta de transducción acoplada a ellos.

Por otra parte, observaciones experimentales muestran que las fibras centrifugas serotoninérgicas tienen una importante distribución terminal en IN inhibitorias en diversas regiones encefálicas de la rata, como la corteza cerebral (20), la corteza visual (21), el tálamo (18), la amígdala basolateral (22) y el núcleo del rafe dorsal (23). En el BO la vía serotoninérgica se distribuye preferentemente en la Capa Glomerular (CG) y secundariamente en la capa Granular (CGr) y capa plexiforme interna (CPI) (3). Por lo tanto, es probable que sus receptores también se encuentren primariamente en IN periglomerulares y secundariamente en IN granulares, lo cual sugiere una acción de 5-HT fundamentalmente indirecta a nivel de las neuronas M/P del BO. Incluso si no existieran receptores serotoninérgicos en células mitrales el efecto observado en este estudio podría estar explicado sólo a

través de IN, debido al tipo de conectividad recíproca dendrodendrítica que presenta el BO (15, 16, 24, 1). De hecho, gracias a este tipo de circuito neuronal, se ha observado que también se producen respuestas complejas en las células M/P, tras la estimulación por odorantes en las neuronas receptoras olfatorias (NRO; 25, 26). De esta manera, las neuronas M/P bajo ciertas circunstancias, responden ya sea con una inhibición seguida por una excitación, o bien, con una excitación seguida de un período de inhibición (27). Este circuito bulbar interconectado permite que en todo el BO la respuesta también consista en una secuencia excitatoria e inhibitoria con frecuencia similar a la de las neuronas M/P. En definitiva, este tipo de conectividad neuronal, sumado a los distintos tipos de receptores serotoninérgicos descritos en el BO, podrían explicar los resultados opuestos que hemos encontrado en neuronas M/P frente a la aplicación de 5-HT.

Una explicación alternativa de los efectos opuestos de la 5-HT en las neuronas de proyección, aunque menos probable, podría atribuirse al efecto de la técnica de corte utilizada en este estudio, ya que podría generar alteración de la conectividad neuronal de las células M/P en forma diferencial. El hecho de que cada célula mitral se proyecte a un glomérulo (28, 29) determina que es probable que en el corte este glomérulo se pueda eliminar sinápticamente de la neurona M/P y así esta perder una importante zona de modulación como es la CG, donde se distribuye principalmente la vía serotoninérgica y donde existe una gran inhibición de las interneuronas periglomerulares sobre las células M/P, generando un desbalance entre excitación e inhibición en un grupo de células de proyección.

Por otra parte el efecto múltiple y opuesto de serotonina no es exclusivo del BO, estudios realizados en otras zonas del SNC han descrito un efecto similar de 5-HT en diversos tipos neuronales, es así como Andrade (1987) (30) reportó la acción de 5-HT en células piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratas *in vitro* mediante el uso de 5-HT, agonistas y antagonistas específicos y caracterizó las respuestas evocadas como bifásicas, consistentes en una hiperpolarización, mediada por receptores 5-HT<sub>1A</sub>, seguida de una despolarización de larga duración atribuida a una disminución de la conductancia al K<sup>+</sup>, no determinando si es mediada por otro o el mismo receptor.

En la corteza cerebral de ratas se han encontrado diversas acciones de 5-HT en neuronas piramidales e interneuronas. Un estudio de Zhou y Hablitz (1999) determinó, mediante el uso de la técnica de *patch clamp*, que pulsos cortos de 5-HT inducen inhibición de estas neuronas, mediante la activación de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, mientras que pulsos prolongados resultan en excitación de las mismas. En nuestros experimentos todos los pulsos pueden considerarse similares.

En un estudio más reciente, Liu y col. (2000) caracterizaron las corrientes sinápticas inducidas por 5-HT en células del núcleo del rafe dorsal (origen de la vía centrífuga serotoninérgica), determinando un aumento dosis dependiente de la frecuencia de corrientes postsinápticas inhibitorias, las cuales son bloqueadas por antagonistas de

receptores GABA<sub>A</sub> (bicuculina 10 mM) y por bloqueadores de canales de Na<sup>+</sup>, sugiriendo que 5-HT podría haber incrementado la actividad de interneuronas GABAérgicas. Mediante el uso de agonistas y antagonistas específicos determinaron que estos efectos serotoninérgicos eran mediados vía receptores 5-HT<sub>2A</sub> y en menor grado 5-HT<sub>2C</sub>.

Estos posibles mecanismos de acción directa o indirecta de la 5-HT no se han estudiado aún para el BO y es probable que siga un patrón similar a lo que ocurre en otras regiones del SNC. Una forma de determinar los posibles mecanismos de los resultados obtenidos en este estudio es la caracterización de los receptores de 5-HT en las distintas células del BO y la consecuencia electrofisiológica de su activación, para esto, los futuros experimentos deberían considerar, primero, el aislamiento sináptico de las neuronas M/P del BO mediante el empleo de bloqueadores de receptores de los neurotransmisores GABA y Glutamato y, segundo, el uso de agonistas y antagonistas específicos de los diferentes tipos de receptores de 5-HT, para así poder identificar los receptores que median las respuestas caracterizadas en este trabajo.

## CONCLUSIONES

Sobre la base de las evidencias expuestas en este trabajo, concluimos que las consecuencias de la activación de receptores serotoninérgicos en el BO, determinadas a través de la técnica *patch clamp* en rebanadas de BO de rata, contemplan efectos opuestos (tanto excitatorios como inhibitorios) en dos poblaciones distintas de neuronas de proyección M/P. Una población de células aumenta su frecuencia de descarga de potenciales de acción y otra población celular disminuye dicha frecuencia en presencia de 5-HT.

Consideramos que los resultados presentados en este trabajo son un aporte importante en la comprensión de los efectos fisiológicos que tendría la vía serotoninérgica en las neuronas de proyección del BO, en el contexto de circuito neuronal real, contribuyendo a la determinación de los posibles efectos moduladores de esta vía en la actividad neuronal del BO de la rata. Así mismo, nuestros resultados nos permiten postular los posibles mecanismos que dan origen a los distintos comportamientos de las neuronas M/P frente a 5-HT. Estos mecanismos propuestos apuntan a efectos directos a través de la activación de distintos receptores serotoninérgicos en las neuronas M/P del BO y/o a efectos indirectos, a través de la activación de receptores de 5-HT en interneuronas inhibitorias sobre las neuronas de proyección M/P.

Futuros experimentos deberán estar orientados a dilucidar estos mecanismos de acción de 5-HT sobre las neuronas de proyección del BO y así poder determinar cuales son los cambios que ocurren en este nivel de procesamiento de la señal olfatoria y definir concretamente una posible modulación centrífuga serotoninérgica, determinante en el proceso de percepción olfatoria.



## BIBLIOGRAFIA

1. **Shepherd G.M.** (1998) The synaptic organization of the brain. (4° Ed.) New York, U.S.A.: Oxford University Press. Ch. 5. pp:159-203.
2. **McLean J.H., A. Darby-King, R.M. Sullivan and S.R. King** (1993). Serotonergic influence on olfactory learning in neonate rat. *Behav. Neural Bio.* 60:152-162.
3. **Shipley M.T. and Ennis M** (1996) Functional Organization of Olfactory System. *J. Neurosci.* 30(1):123-176.
4. **Jiang M., E.R. Griff, M. Ennis, L.A. Zimmer and M.T. Shipley.** (1996). Activation of locus coeruleus enhances the responses of olfactory bulb mitral cells to weak olfactory nerve input. *J. Neurosci.* 16:6319-6329.
5. **Moriizumi T., Tsukatani T., Sakashita H. & Miwa T.** (1994) Olfactory disturbance induced by deafferentation of serotonergic fibers in the olfactory bulb. *Neurosci.* 61:733-738.
6. **McLean J.H., Darby-King A., Hodge E.** (1996) 5-HT<sub>2</sub> receptor involvement in conditioned olfactory learning in the neonate rat pup. *Behav. Neurosci.* 110(6):1426-34
7. **Price T.L., Darby-King A, Harley C.W., McLean J.H.** (1998) Serotonin plays a permissive role in conditioned olfactory learning induced by norepinephrine in the neonate rat. *Behav. Neurosci.* 112(6):1430-1437.
8. **Castillo P.E., Carleton A., Vincent J-D. and Lledo P-M.** (1999) Multiple and Opposing Roles of Cholinergic Transmission in the Main Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 19(21):9180-9191.
9. **Mori K.** (1987) Membrane and Synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb. *Prog. in neurobiol.* 29:275-320.
10. **Barnes NM, Sharp T.** (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 1999 Aug;38(8):1083-152.
11. **Pompeiano M., Palacios J.M. and Mengod G** (1992) Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the rat brain: Correlation with receptor binding. *J. Neurosci.* 12:440-453.
12. **Morilak D.A., Garlow S.J. & Ciaranello R.D.** (1993) Immunocytochemical localization and description of neurons expressing serotonin 2 receptors in rat brain. *Neurosci.* 54:701-717.
13. **Gehlert D.R., Gaclenheimer S.L., Wong D.T. and Robertson D.W.** (1991) Localization of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat brain using [3H]LY278584. *Brain Res.* 553:149-154.
14. **Berkowicz D.A., P.Q. Trombley and G.M. Shepherd.** (1994). Evidence for glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter. *J Neurophysiol.* 71:2557-2561.
15. **Cotman C.W., D.T. Monaghan, O.P. Ottersen and J. Storm-Mathisen.** (1987). Anatomical organization of excitatory amino acids receptors and their pathways. *Trends Neurosci.* 10:273-280.
16. **Ribak C.E., J.E. Vaughn, K. Saito, R. Barber & E. Roberts.** (1977) Glutamate decarboxylase localization in neurons in the olfactory bulb. *Brain Res.* 126:1-18.
17. **Bloom FE y Costa E.** (1971). The effects of drugs on serotonergic nerve terminals. *Adv Cytopharmacol.* 1971 May;1:379-95.
18. **Andrade R.** (1998) Regulation of membrane excitability in the central nervous system by serotonin receptor subtypes. *In: Advances in Serotonin receptor research.* *Ann.of N.Y. Acad. of Sci.* 861:190-203.
19. **North R.A. and N. Uchimura.** (1989). 5-Hydroxytryptamine acts at 5-HT<sub>2</sub> receptors to decrease potassium conductance in rat nucleus accumbens neurons. *J. Physiol.* 417:1-12.
20. **Zhou FM, Hablitz JJ.** (1999). Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 1999 Dec;82(6):2989-99.
21. **Xiang Z, Prince DA.** (2003). Heterogeneous actions of serotonin on interneurons in rat visual cortex. *J Neurophysiol.* 2003 Mar; 89(3): 1278-87.
22. **Rainnie D.** (1999). Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.* Jul;82(1):69-85.
23. **Liu R., Jolas T., Aghajanian G.** (2000). Serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res.* 873:34-18.
24. **Martin J. H.** (1999) Neuroanatomía. (2° Ed.) PRENTICE HALL, Madrid, España. Cap. 2. pp:234-240.
25. **Aroniadou-Anderjaska V., M. Ennis and M. T. Shipley.** (1997). Glomerular synaptic responses to olfactory nerve input in rat olfactory bulb slices. *Neurosci.* 79:425-434.
26. **Hamilton K. A. and J. S. Kauer** (1985). Intracellular potentials of salamander mitral/tufted neurons in response to odor stimulation. *Brain Res.* 338:181-185.
27. **Wellis D. P. and J. W. Scott** (1990). Intracellular responses of identified rat olfactory bulb interneurons to electrical and odor stimulation. *J. Neurophysiol.* 64:932-947.
28. **Ressler K. J., S. L. Sullivan and L. B. Buck** (1994) Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79:1245-1255.
29. **Vassar R., S. K. Chao, R. Sitcheran, J. M. Nuñez, L. B. Vosshall and R. Axel** (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79:981-991.
30. **Andrade R and Nicoll RA.** (1987). Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. *J. Physiol.* 394:99-124.