

**VNiVERSiDAD D SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA**



**PLASTICIDAD DEL SISTEMA  
GLUTAMATÉRGICO EN LA VÍA OLFATORIA  
DE ROEDORES SOMETIDOS A  
DEPRIVACIÓN SENSORIAL. ESTUDIO DEL  
RECEPTOR mGluR1a EN EL BULBO  
OLFATORIO.**

**-TESIS DOCTORAL-**

**M<sup>a</sup> VICTORIA BARBADO GONZÁLEZ**

**Salamanca, 2011**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**PLASTICIDAD DEL SISTEMA  
GLUTAMATÉRGICO EN LA VÍA OLFATORIA  
DE ROEDORES SOMETIDOS A  
DEPRIVACIÓN SENSORIAL. ESTUDIO DEL  
RECEPTOR mGluR1a EN EL BULBO  
OLFATORIO.**

**-TESIS DOCTORAL-**

**M<sup>a</sup> VICTORIA BARBADO GONZÁLEZ**

Salamanca, Septiembre 2011



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA**

**PLASTICIDAD DEL SISTEMA  
GLUTAMATÉRGICO EN LA VÍA OLFATORIA  
DE ROEDORES SOMETIDOS A  
DEPRIVACIÓN SENSORIAL. ESTUDIO DEL  
RECEPTOR mGluR1a EN EL BULBO  
OLFATORIO.**

Memoria presentada por *M<sup>a</sup> Victoria Barbado González* para optar al  
grado de Doctor por la Universidad de Salamanca  
Salamanca, Septiembre 2011

El Director:

Prof. Dr. D. Jesús María García Briñón



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA**

**PLASTICIDAD DEL SISTEMA  
GLUTAMATÉRGICO EN LA VÍA OLFATORIA  
DE ROEDORES SOMETIDOS A  
DEPRIVACIÓN SENSORIAL. ESTUDIO DEL  
RECEPTOR mGluR1a EN EL BULBO  
OLFATORIO.**

María Victoria Barbado González

Salamanca, Septiembre 2011



VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
CELULAR Y PATOLOGÍA**

Facultad de Medicina. Avda. Alfonso X, el Sabio s/n  
37007 - Salamanca  
Tel . (34) 923 29 45 00 Ext. 1854 Fax . (34) 923 29 45 49

Jesús María García Briñón, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Salamanca

HAGO CONSTAR:

Que el trabajo titulado **“Plasticidad del sistema glutamatérgico en la vía olfatoria de roedores sometidos a privación sensorial. Estudio del receptor mGluR1a en el bulbo olfatorio”**, ha sido realizado por Dña. María Victoria Barbado González en el Departamento de Biología Celular y Patología bajo mi dirección y, en mi opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendido como Tesis Doctoral de la Universidad de Salamanca, por lo cual **autorizo** su presentación.

Para que así conste, lo firmo en Salamanca a 6 de septiembre de 2011.

Fdo.: Jesús María García Briñón

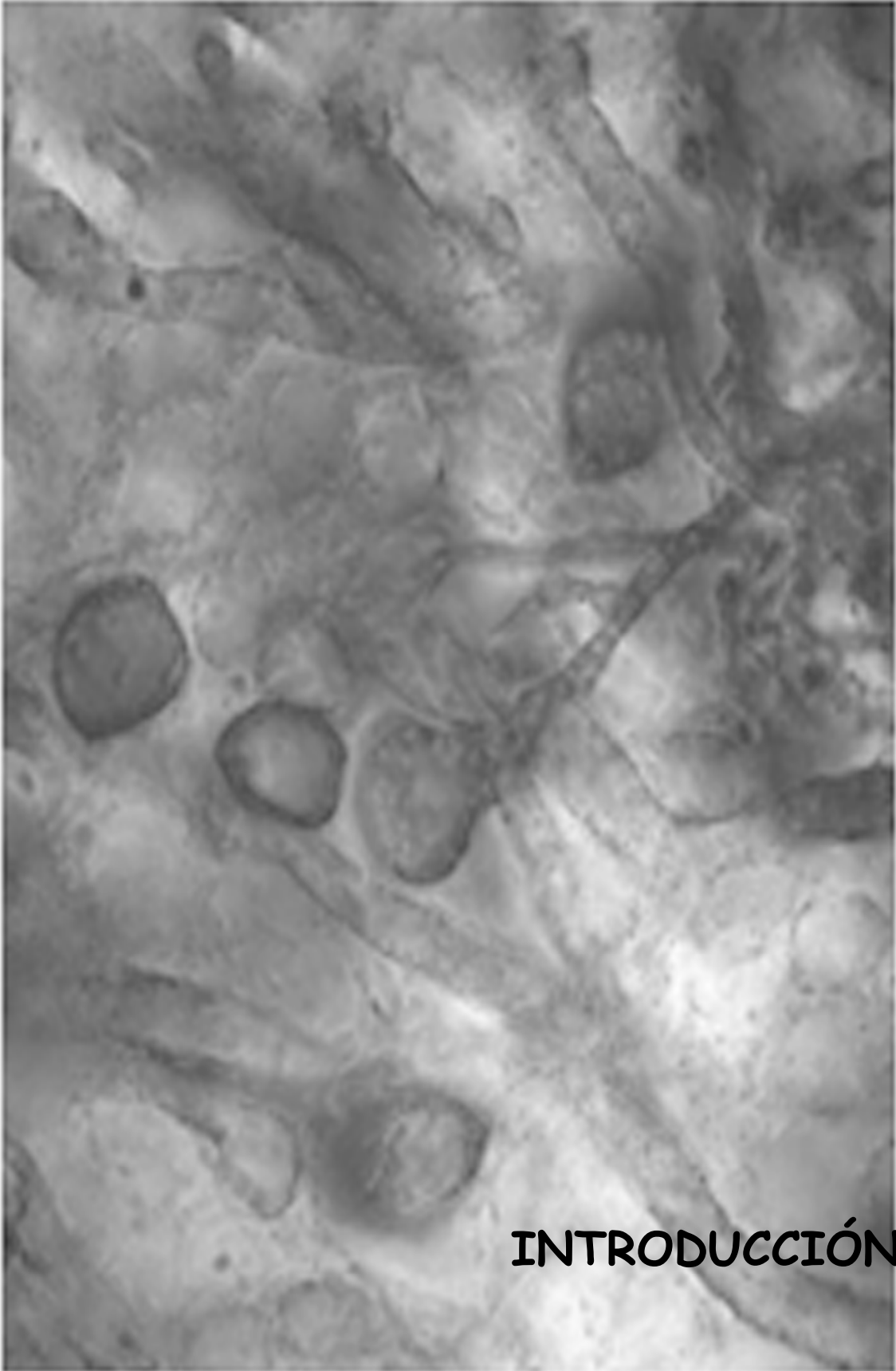
<b>INTRODUCCIÓN</b>	pag. 1
<b>LA NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA</b>	pag. 6
1. EL GLUTAMATO COMO NEUROTRANSMISOR	pag. 6
2. LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO	pag. 7
3. LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO (mGluRs)	pag. 9
4. LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO COMO RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G	pag. 10
5. CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO	pag. 13
6. LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO DEL GRUPO I	pag. 17
7. EL RECEPTOR METABOTRÓPICO DE GLUTAMATO TIPO 1	pag. 18
-LA ISOFORMA $\alpha$ DEL RECEPTOR: mGluR1a	pag. 20
-DIMERIZACIÓN DEL mGluR1a	pag. 21
-EL mGluR1a EN EL ELEMENTO POSTSINÁPTICO DE LA SINAPSI GLUTAMATÉRGICA	pag. 24
<b>EL SISTEMA OLFATORIO</b>	pag. 29
1. ARQUITECTURA DEL BULBO OLFATORIO: DISTRIBUCIÓN DE CAPAS Y DE TIPOS NEURONALES	pag. 31
-CAPA DE FIBRAS DEL NERVI OLFATORIO (CFNO)	pag. 31
-CAPA GLOMERULAR (CGL)	pag. 31
-CAPA PLEXIFORME EXTERNA (CPE)	pag. 33
-CAPA DE LAS CÉLULAS MITRALES (CCM)	pag. 36
-CAPA PLEXIFORME INTERNA (CPI)	pag. 37
-CAPA DE LAS CÉLULAS GRANO (CCG)	pag. 38
2. ORGANIZACIÓN SINÁPTICA DEL BULBO OLFATORIO	pag. 39
2.1. CIRCUITO DE ENTRADA: MAPA TOPOGRÁFICO OLFATORIO	pag. 42
2.2. COMPARTIMENTALIZACIÓN DE LOS GLOMÉRULOS	pag. 42
2.3. REGULACIÓN RETROINHIBITORIA DEL NERVI OLFATORIO	pag. 43
2.4. MODULACIÓN DE LA SEÑAL AFERENTE OLFATORIA: EL CIRCUITO GLOMERULAR	pag. 44
2.5. REGULACIÓN CENTRÍFUGA DEL CIRCUITO GLOMERULAR	pag. 47
2.6. MODULACIÓN DE LA SEÑAL EFERENTE OLFATORIA: EL CIRCUITO INFRAGLOMERULAR	pag. 48
2.7. AUTOEXCITACIÓN NO-SINÁPTICA DE CÉLULAS MITRALES	pag. 50
2.8. SISTEMA DE ASOCIACIÓN INTRABULBAR	pag. 51
2.9. PROYECCIONES A LA CORTEZA OLFATORIA PRIMARIA	pag. 52
3. GLUTAMATO EN EL BULBO OLFATORIO	pag. 53
4. EL BULBO OLFATORIO COMO REGIÓN EXPERIMENTAL	pag. 54

<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	pag. 59
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	pag. 65
1.- MATERIAL	pag. 67
1.1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	pag. 67
2.- MÉTODOS	pag. 69
<b>2.1.- PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO</b>	pag. 69
2.1.1.- DEPRIVACIÓN OLFATORIA UNILATERAL NEONATAL	pag. 69
2.1.2.- MANTENIMIENTO POSTOPERATORIO	pag. 70
<b>2.2.- ESTUDIO NEUROHISTOLÓGICO</b>	pag. 72
2.2.1.- FIJACIÓN DEL TEJIDO Y SECCIONAMIENTO	pag. 72
# PERFUSIÓN	pag. 72
# ENCASTRADO/INCLUSIÓN Y OBTENCIÓN DE SECCIONES	pag. 74
# TINCIONES	pag. 77
Tinción de Nissl sobre secciones de vibratomo	pag. 77
Método Inmunohistoquímico	pag. 77
Contratinción de azul de toluidina sobre secciones semifinas	pag. 81
Contrastado de cortes ultrafinos sobre rejillas	pag. 82
Método inmunofluorescente	pag. 84
# ANÁLISIS Y DOCUMENTACIÓN	pag. 88
Recuento celular y análisis estadístico	pag. 88
<b>2.3.- ESTUDIO PROTEÓMICO</b>	pag. 90
2.3.1.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	pag. 92
# DECAPITACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS	pag. 92
# PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CELULARES	pag. 93
2.3.2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEÍCA	pag. 95
# MÉTODO COLORIMÉTRICO DE BRADFORD	pag. 95
2.3.3.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA	pag. 96
# PREPARACIÓN DE LOS GELES	pag. 97
# PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA ELECTROFORESIS	pag. 98
# ELECTROFORESIS	pag. 99
2.3.4.- ELECTROTRANSFERENCIA	pag. 99
# VISUALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	pag. 100
2.3.5.- INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS	pag. 100
2.3.6.- DENSITOMETRÍA	pag. 101

<b>RESULTADOS</b>	pag. 103
CONTROL DEL PROCEDIMIENTO DE DEPRIVACIÓN OLFATORIA	pag. 106
<b>1.- CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA EXPRESIÓN DEL mGluR1a EN EL BULBO OLFATORIO</b>	pag. 108
ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL mGluR1a.	
LOCALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN	pag. 108
Patrón de expresión en la capa glomerular	pag. 109
Patrón de expresión en la capa plexiforme externa	pag. 114
Patrón de expresión en la capa de las células mitrales	pag. 116
Patrón de expresión en las capas inframitrales	pag. 119
Características del inmunomarcaje del mGluR1a	pag. 120
MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN DE mGluR1a EN EL BULBO OLFATORIO EN AUSENCIA DE ESTIMULACIÓN AFERENTE.	pag. 122
Efectos de la deprivación en la capa glomerular	pag. 123
Efectos de la deprivación en la capa plexiforme externa	pag. 128
Efectos de la deprivación en la capa de las células mitrales	pag. 131
Efectos de la deprivación en la capa plexiforme interna	pag. 131
RESUMEN DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS EFECTOS DE LA DEPRIVACIÓN OLFATORIA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL mGluR1a.	pag. 133
<b>2.- ESTUDIO DE COLOCALIZACIÓN. CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DE LAS NEURONAS POSITIVAS A mGluR1a</b>	pag. 136
Coexpresión de mGluR1a con VGLUT2.	
Caracterización de neuronas glutamatérgicas	pag. 136
Coexpresión de mGluR1a con tirosina hidroxilasa, calbindina D-28k y calretinina. Caracterización de tipos de células periglomerulares.	pag. 140
Coexpresión de mGluR1a con neurocalcina y colecistoquinina.	
Caracterización de células empenachadas externas, superficiales y medias.	pag. 143
RESUMEN DE LA CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DE LAS NEURONAS POSITIVAS A mGluR1a	pag. 146
<b>3.- ANÁLISIS PROTEICO DEL mGluR1a POR ELECTROFORESIS-WESTERN-BLOTTING</b>	pag. 147
CONSIDERACIONES TÉCNICAS DEL ANÁLISIS PROTEICO	pag. 147
ANÁLISIS PROTEICO EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES	pag. 149
ANÁLISIS PROTEICO EN CONDICIONES NATIVAS	pag. 151
CONDICIONES DESNATURALIZANTES vs NATIVAS	pag. 154



RESUMEN DEL ANÁLISIS PROTEICO DEL mGluR1a	pag. 161
<b>DISCUSIÓN</b>	pag. 163
<b>DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO</b>	pag. 166
POBLACIONES NEURONALES POSITIVAS A mGluR1a	pag. 166
mGluR1a en las neuronas de proyección	pag. 167
mGluR1a en las células yuxtglomerulares	pag. 169
mGluR1a en otras poblaciones interneuronales	pag. 171
CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DE LAS NEURONAS POSITIVAS A mGluR1a	pag. 174
VGLUT2 marcador de células glutamatérgicas	pag. 175
Marcadores de células periglomerulares	pag. 177
Colecistoquinina y Neurocalcina: marcadores de células empenachadas	pag. 180
DEPRIVACIÓN OLFATORIA	pag. 183
Estudios de colocalización en condiciones de deprivación	pag. 186
<b>DEL ANÁLISIS PROTEICO</b>	pag. 190
CONSIDERACIONES TÉCNICAS EN EL ESTUDIO PROTEÓMICO	pag. 190
De la terminología	pag. 190
Del análisis comparativo	pag. 191
De la unificación de la técnica	pag. 191
De la elección de los detergentes	pag. 192
De la degradación proteica post-extracción	pag. 195
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL mGluR1a	pag. 197
De la detección de la conformación monomérica	pag. 197
De la detección de la conformación dimérica en condiciones desnaturalizantes	pag. 198
De la identidad de las especies proteicas que migran a las bandas de los 150 y 160 kDa	pag. 202
De la expresión de los dímeros-mGluR1a en el aumento del inmunomarcaje dendrítico en ausencia de estímulo sensorial	pag. 210
De la expresión del complejo mGluR1a-Homer1a en el aumento del marcaje inmunohistoquímico dendrítico en ausencia de estimulación aferente	pag. 213
De la expresión de monómeros-mGluR1a en el marcaje inmunohistoquímico de los somas neuronales en ausencia de estímulo sensorial	pag. 215
Implicaciones funcionales	pag. 217
<b>CONCLUSIONES</b>	pag. 227
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	pag. 231



**INTRODUCCIÓN**

Ya en la conferencia de apertura de la British Royal Society en 1884, Ramón y Cajal sugirió por vez primera que los procesos de aprendizaje podrían provocar cambios morfológicos permanentes en las conexiones sinápticas. Desde entonces uno de los grandes retos de la Neurociencia ha sido desentrañar los mecanismos que subyacen a estos cambios sinápticos.

El SNC es capaz de experimentar cambios estructurales y funcionales para minimizar los efectos de alteraciones normales o patológicas que pueden ocurrir en cualquier momento del desarrollo o de la vida adulta (Zilles, 1992). Se conoce como plasticidad neural a la capacidad para desarrollar una reorganización estructural y/o funcional de los elementos del SNC para adaptarse a una nueva situación o adquirir nuevas capacidades.

Según la literatura, una de las regiones del SNC de mayor plasticidad es el sistema olfatorio (para una revisión ver Brennan y Keverne, 1997; Wilson y cols., 2004; Elvsåshagen y Malt, 2008). La vía olfatoria de mamíferos es excepcionalmente plástica debido a que presenta unas ciertas características de "inmadurez" a lo largo de toda la vida. En este sentido, el bulbo olfatorio sufre un permanente recambio de los axones procedentes de las neuronas receptoras olfatorias y, a la vez, un continuo aporte de nuevas neuronas que llegan a él, a través de la cadena migratoria rostral, desde la zona subventricular de los ventrículos laterales, donde se generan (Graziadei y Graziadei, 1979; Luskin, 1998; Lois y Álvarez Buylla, 1994). Pero además son muchas las observaciones experimentales que han demostrado que la circuitería del bulbo olfatorio está sometida a un alto grado de plasticidad en respuesta a la entrada de nuevos odorantes (Mandairon y cols., 2008; rev. Mandairon y Linster, 2009; Migliore y cols., 2010). El bulbo olfatorio es considerado un sistema neural inherentemente plástico, que se ve modificado por la experiencia sensorial (Johnson y cols., 1995; Hamilton y Coppola, 2003; Wilson y cols., 2004). En resumen, el bulbo olfatorio tiene una gran capacidad plástica no sólo por su "inmadurez" sino también porque es una estructura plástica *per se*.

Todo esto implica un continuo reordenamiento sináptico en gran parte de los elementos que integran esta estructura. Debido a ello, el bulbo olfatorio representa

un modelo perfecto donde estudiar los mecanismos de plasticidad desencadenados a partir de modificaciones exógenas a las que un sistema neural responde de modo adaptativo.

Los paradigmas experimentales utilizados para estudiar estos fenómenos de plasticidad suelen apoyarse en la modificación de la tasa de actividad sensorial aferente bien conseguida a través de modelos funcionales (deprivación sensorial olfatoria), o bien a través de modelos genéticos en los que tiene lugar la pérdida selectiva de algún/os tipos celulares del bulbo olfatorio.

El estudio de las consecuencias fisiológicas, neuroquímicas y/o neurohistológicas que tienen lugar en un determinado sistema sensorial tras la modificación de la cantidad o calidad de la información sensorial que se procesa a través de él, constituye un buen modelo experimental no sólo para el estudio del desarrollo y de la capacidad de readaptación de sus componentes, sino también para el conocimiento de los circuitos neuronales y la fisiología de sistema sensorial. El análisis de los cambios observados en la situación experimental comparada con la control, ha proporcionado información muy valiosa para el conocimiento de la estructura, desarrollo y capacidad de adaptación de sistemas sensoriales como el olfatorio (para una revisión ver Brunjes, 1994).

Existen diferentes formas de llevar a cabo la manipulación de la información sensorial que llega a un determinado sistema. Estos métodos, de forma general, se agrupan en dos basándose en el grado de preservación física de la vía sensorial para conseguir la deprivación de estimulación aferente. Así, los métodos de deaferenciación consisten en interrumpir físicamente la vía (mediante seccionamiento de tractos o eliminación de algunas estructuras integrantes de la misma). Se habla de deprivación, cuando la vía sensorial permanece intacta, pero se limita la cantidad de información que accede al sistema sensorial. En el caso del sistema olfatorio el método más usual de deprivación consiste en suturar una de las narinas para impedir el acceso de odorantes a la mucosa olfatoria.

Los fenómenos de plasticidad en el sistema olfatorio han sido demostrados tanto por métodos de deaferenciación como de deprivación, revelando la existencia

de llamativos cambios adaptativos por parte de este sistema, como veremos más adelante.

De los estudios de plasticidad, hay muchos dirigidos a tratar de dilucidar los mecanismos que median la potenciación o debilitación de la "fuerza" sináptica, así como otros mecanismos de plasticidad que tienen lugar en respuesta a cambios en las condiciones normales del medio. Todos los estudios sobre plasticidad convergen en un concepto común: el sistema glutamatérgico está implicado en numerosos procesos plásticos, y el glutamato y sus receptores son esenciales para la inducción y mantenimiento de diferentes formas de plasticidad sináptica, como por ejemplo los conocidos fenómenos de potenciación y depresión a largo plazo (Roche y cols., 1994; Bortolotto y cols., 1999a, b; Zamanillo y cols., 1999; Liu y cols., 2004; Sala y cols., 2005; Sobczyk y Svoboda, 2007; MacDonald y cols., 2006; Holbro y cols., 2009; Fu y Zou, 2011). La mayoría de estos estudios se han realizado en el hipocampo y han sido especialmente informativos para desentrañar el papel del glutamato en estos procesos de plasticidad sináptica (Lisman, 2003).

El glutamato, actuando a través de canales ionotrópicos AMPA provoca la despolarización de la membrana mediante una entrada masiva de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y, a su vez, desencadena la activación de receptores NMDA que incrementa la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rao y Finkbeiner, 2007). A través de los receptores metabotrópicos, que se encuentran acoplados a proteínas *G*, se produce la activación de la fosfolipasa *C* con la consecuente producción de inositol trifosfato que desencadena un incremento añadido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por su salida desde el retículo endoplasmático y la activación de diferentes elementos de la cascada de señalización, entre otras, proteín kinasas (Gerber y cols., 2007).

Esta elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por efecto del glutamato activa tanto kinasas como fosfatasa que actúan sobre una gran variedad de sustratos que incluyen canales iónicos y proteínas del citoesqueleto que median en el remodelado local de las espinas postsinápticas y factores de transcripción, como CREB y NF- $\kappa$ B, que promueven fenómenos que van desde la supervivencia celular, hasta muy variadas

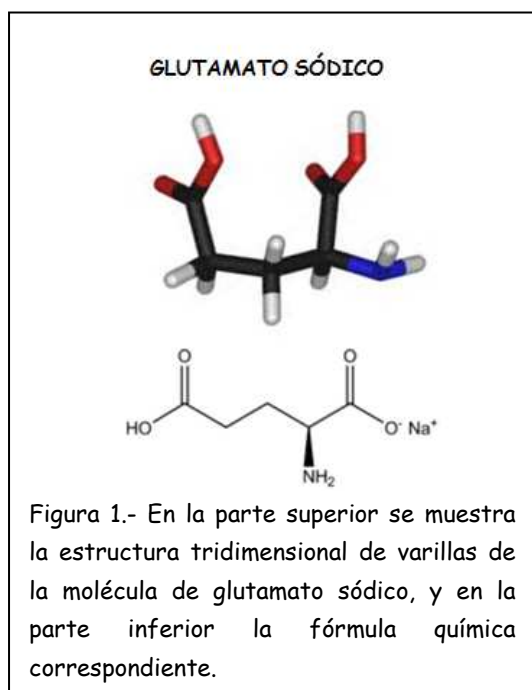
formas de plasticidad neural (Mattson y Meffert, 2006; Miyamoto, 2006; Wu y Lynch, 2006).

En estos procesos, como hemos apuntado anteriormente, están implicados tanto receptores ionotrópicos como metabotrópicos de glutamato. Dentro de estos últimos, un tipo que es de especial importancia es el mGluR1a, ya que se ha demostrado que interviene en la regulación de procesos de plasticidad sináptica en el cerebelo y en el hipocampo (Aiba y cols., 1994a, b; Conquet y cols., 1994) y que los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediados por él, están implicados en muchos procesos neuromodulatorios entre los que podemos destacar cambios a largo plazo en la función sináptica en variadas regiones del SNC (Aiba y cols., 1994a, b; Lapointe y cols., 2004).

## LA NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

### 1. EL GLUTAMATO COMO NEUROTRANSMISOR

Clásicamente se consideraba que los neurotransmisores por excelencia eran



moléculas relativamente complejas como la acetilcolina o las catecolaminas. Posteriormente, en los años 50, se comprobó la gran importancia en la funcionalidad del SNC de moléculas más sencillas, como el caso del L-glutamato o L- aspartato.

La acción excitatoria del L-glutamato en el cerebro fue descubierta en 1952 (Hayashi, 1952), desde entonces, el glutamato, en su forma de sal sódica (fig. 1), ha sido considerado el principal mediador de señales excitatorias en el SNC de mamíferos.

Este aminoácido no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que debe ser sintetizado en las neuronas y células gliales del SNC y, posteriormente, ser

almacenado en vesículas situadas en los terminales sinápticos, mediante un proceso dependiente de ATP y  $Mg^{2+}$ .

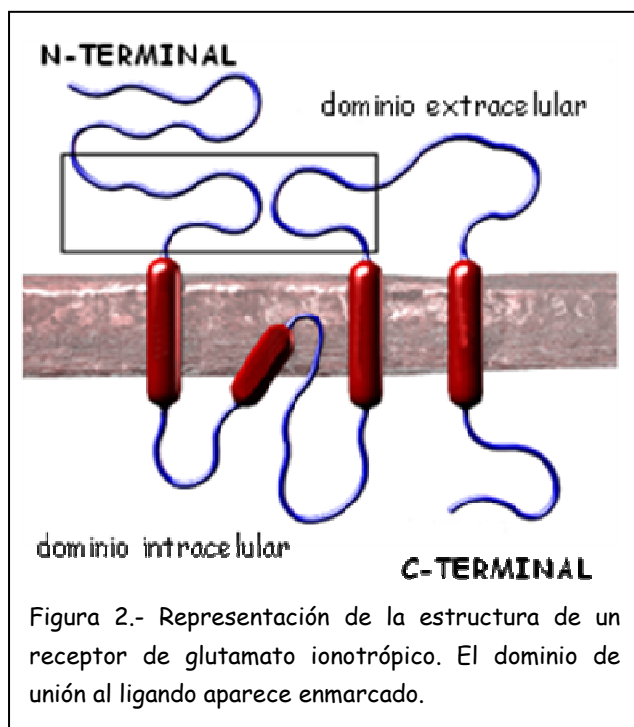
Las sinapsis glutamatérgicas constituyen el sistema de neurotransmisión excitatoria rápida más abundante en el SNC de los mamíferos. En los últimos años se ha producido un avance espectacular en el conocimiento molecular, bioquímico, farmacológico y funcional de estas sinapsis, cuyo interés obedece fundamentalmente a dos razones. Por un lado, porque cambios perdurables en la eficacia de la transmisión glutamatérgica constituyen un aspecto esencial en los fenómenos de plasticidad sináptica, tanto durante el desarrollo como en el adulto, (entre ellos se pueden incluir los procesos de aprendizaje y memoria). En segundo lugar, porque una elevación anormal de la liberación de glutamato en la sinapsis es la causa de la degeneración y muerte neuronal asociada a determinadas patologías, tanto de aparición aguda (como las derivadas de situaciones de hipoglucemia, hipoxia e isquemia cerebrales), como de evolución crónica, asociadas a algunos procesos neurodegenerativos (enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington) (Monaghan y cols., 1989; Meldrum y Garthwaite, 1990; Schoepp y cols., 1990).

## 2. LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO

Durante muchos años, la comprensión de la actividad del glutamato fue dominada por la fisiología de los receptores ionotrópicos, los cuales, como receptores asociados a canales catiónicos, median una transmisión sináptica excitatoria rápida (Hollmann y Heinemann, 1994; Ehlers, 1999). Los receptores ionotrópicos se clasifican en función de la farmacología de su ligando específico y la homología en la secuencia de sus subunidades. Así, se dividen en receptores sensibles a N-metil-D-aspartato (receptores NMDA), receptores sensibles a  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5metilisoaxazolil-4-propionato (receptores AMPA) y receptores sensibles a kainato (receptores kainato). La localización de los receptores AMPA y NMDA es fundamentalmente postsináptica, mientras que los de kainato se localizan tanto a nivel postsináptico como presináptico.

La unidad funcional de los receptores ionotrópicos está formada por un complejo de 4 subunidades que se ordenan alrededor de un poro permeable a cationes.

Todas las subunidades presentan una estructura común formada por 4 dominios transmembrana, un dominio amino-terminal largo y uno carboxilo corto (fig. 2 y 3) (Hollman y Heinemann, 1994). Los receptores AMPA activan canales iónicos permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , y en algunos casos a  $\text{Ca}^{2+}$ , e intervienen principalmente en la



transmisión glutamatérgica rápida.

Los receptores NMDA son complejos proteicos heteroméricos que constituyen canales regulados por ligando y por voltaje que son permeables a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Requieren la presencia de glutamato y la previa despolarización de la membrana para liberar el  $\text{Mg}^{2+}$  que los bloquea. Éstos parecen tener un papel más especializado en los procesos de plasticidad neural. El papel fisiológico de los receptores de kainato es

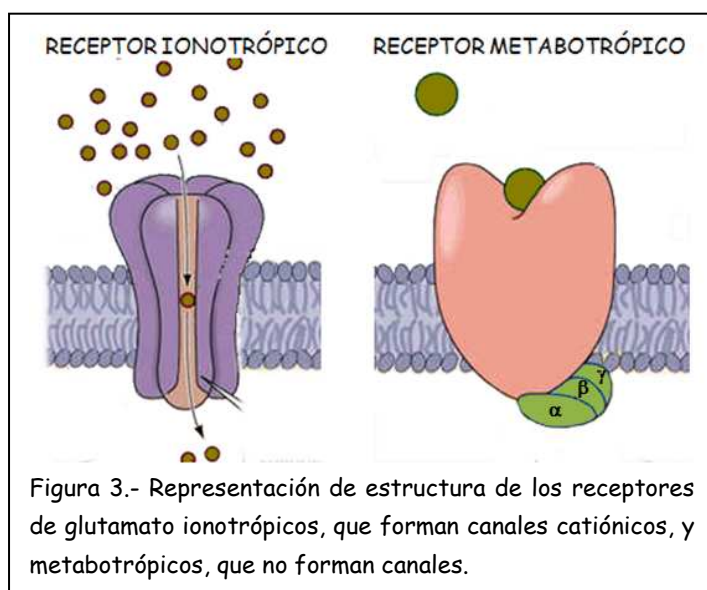
menos conocido, aunque parecen implicados, a nivel presináptico, en la modulación de la transmisión GABAérgica (Nakanishi, 1992).

Sin embargo, en 1985, Sladeczek y colaboradores demostraron la presencia de receptores de glutamato insensibles a AMPA, kainato y NMDA, y que, sin embargo, estimulaban la actividad de fosfolipasa C y la formación de inositol trifosfato a través de la activación de proteínas G. Estas evidencias llevaron a pensar que, al igual que otros muchos neurotransmisores, el L-Glutamato no sólo activaba canales iónicos, sino que también era capaz de actuar a través de proteínas G, mediante su unión a receptores metabotrópicos (mGluRs).

El descubrimiento de los mGluRs distorsionó la visión tradicional de la neurotransmisión glutamatérgica, ya que podían modular la actividad en los circuitos de una manera sólo asociada hasta entonces con neuromoduladores no-glutamatérgicos como dopamina, acetilcolina, serotonina o noradrenalina. A diferencia



de los receptores para estos neuromoduladores, los mGluRs proporcionan un



mecanismo por el cual, el mismo ligando, puede regular la actividad neuronal a largo plazo en la misma sinapsis en la cual provoca una respuesta sináptica rápida (Conn y Pin 1997).

Poco después fue clonado el primer receptor metabotrópico de glutamato por expresión funcional, en dos

laboratorios simultáneamente, y fue denominado mGluR1 (Houamed y cols. 1991; Masu y cols., 1991). La secuencia del mGluR1 fue utilizada tanto para el diseño de oligonucleótidos generados para la técnica de PCR, como para la generación de sondas para el rastreo de genotecas de cDNA. Estos estudios dieron como resultado la aparición de siete nuevos genes relacionados y algunas variantes resultantes del distinto procesamiento del mismo mRNA que como veremos más adelante generan diferentes isoformas proteicas (Abe y cols., 1992, Pin y cols., 1992, Tanabe y cols., 1992 Minakami y cols., 1993, Nakajima y cols., 1993, Okamoto y cols., 1994, Saugstad y cols., 1994, Duvoisin y cols., 1995).

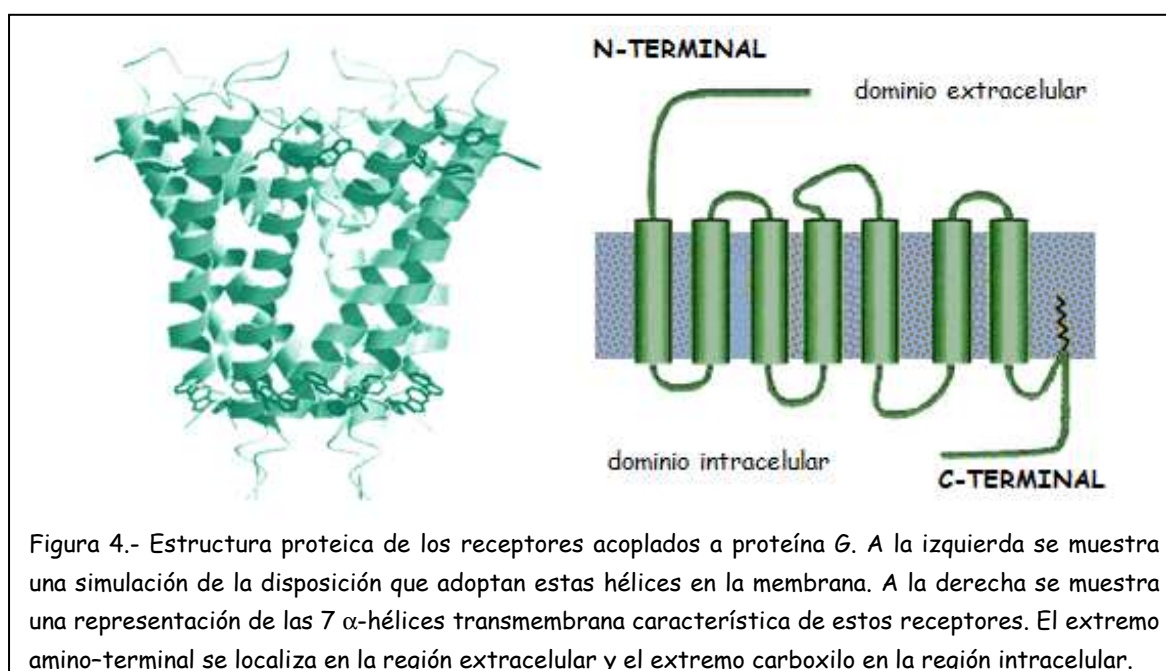
### 3. LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO (mGluRs)

Los mGluRs constituyen un conjunto de receptores acoplados a proteínas G que realizan sus funciones a través de cascadas de segundos mensajeros intracelulares que promueven la regulación de la actividad de diferentes proteínas, o bien a través de la modulación directa, o indirecta, de canales iónicos. De este modo permiten la transducción de señales excitatorias relativamente cortas, en cambios a largo plazo en la actividad sináptica a través de sistemas de activación de segundos mensajeros

(Bockaert y Pin, 1999; Costantino y cols., 2001; De Blasi y cols., 2001; Hermans y Challiss, 2001; Jingami y cols., 2003). Como consecuencia de esto, los mGluRs juegan un papel decisivo en procesos relacionados con el desarrollo neural, plasticidad sináptica e, incluso, en procesos neurodegenerativos (Anwyl, 1991; Aiba y cols., 1994a, b; Conquet y cols., 1994; Nakanishi y Masu, 1994; Riedel, 1996; Bordi y Ugolini, 1999; Dale y cols., 2000).

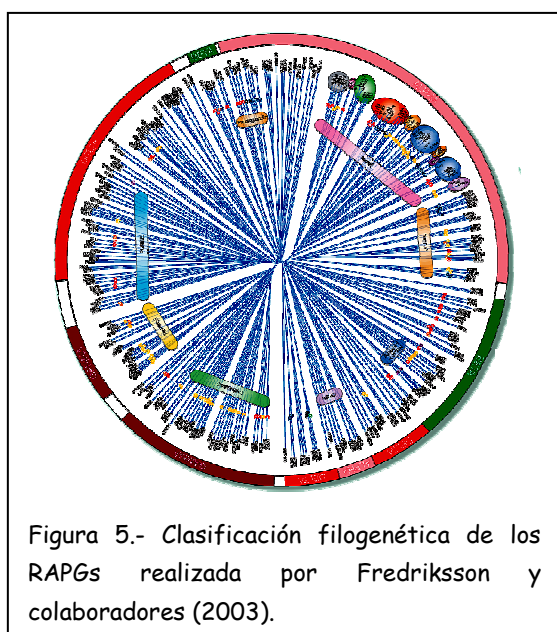
#### 4. LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO COMO RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

Los receptores acoplados a proteínas G (RAPGs) constituyen la familia de proteínas más numerosa y diversa conocida, representada por más de 1000 miembros en vertebrados (Bockaert y Pin, 1999; Hermans, 2003). Su nombre deriva de la capacidad de estos receptores para reclutar y regular la actividad intracelular de las proteínas G. Estos receptores se localizan en la superficie celular y su principal función es transducir el estímulo extracelular (unión del ligando) en una señal intracelular (activación de efectores o segundos mensajeros) a través de su interacción con proteínas G heterotriméricas (Hermans, 2003; Kroeze y cols., 2003; Moepps y Fagni, 2003).



Los RAPGs son proteínas integrales de membrana formadas por una sola cadena proteica, en cuya secuencia primaria se pueden identificar siete regiones de marcada hidrofobicidad que atraviesan la membrana adoptando, cada una de ellas, una estructura de  $\alpha$ -hélice (fig. 4). El conjunto de las siete hélices forma un núcleo transmembrana muy estable y, a la vez, flexible, que determina la principal característica de esta familia de receptores (Hamm y Gilchrist, 1996; Jingami y cols., 2003; Kroeze y cols., 2003).

En los RAPGs el dominio amino-terminal es extracelular, permitiendo la unión del ligando y siendo susceptible a procesos de glicosilación. Por su parte, el segmento carboxi-terminal queda dispuesto intracelularmente, y contiene los sitios de unión a efectores, así como lugares de fosforilación y palmitoilación que permiten la desensibilización e internalización del receptor (Hermans, 2003; Kroeze y cols., 2003).

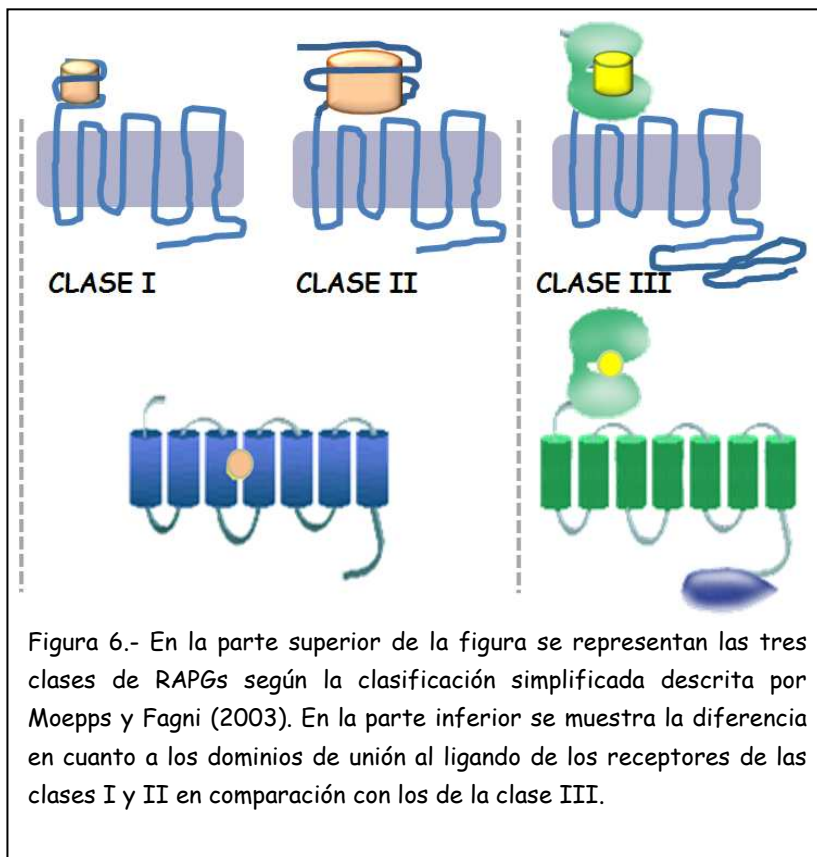


Se han establecido diferentes clasificaciones de las RAPGs en función de su filogenia (Fredriksson y cols., 2003) o de sus secuencias y funciones conocidas (Kroeze y cols., 2003), pero suelen ser clasificaciones extremadamente complejas debido a la abundancia de miembros en esta familia de receptores, como evidencia la complejidad del diagrama que se muestra en la figura 5. La clasificación más simple agrupa a los RAPGs en 3 clases de

acuerdo a su secuencia y características estructurales (Moepps y Fagni, 2003). De este modo se diferencian los receptores con un corto dominio extracelular y que son activados por ligandos molecularmente pequeños (clase I), los que poseen un largo dominio extracelular y activados por grandes péptidos (clase II), y los receptores de la clase III, a la que pertenecen los mGluRs, el receptor sensor de calcio extracelular (RCa) y el receptor  $GABA_B$ , se caracterizan por presentar un segmento extracelular

considerablemente largo que se pliega para formar un característico dominio bilobulado de unión al ligando (fig. 6)

Los mGluRs presentan la típica estructura de 7  $\alpha$ -hélices transmembrana y están acoplados a proteínas *G*, pero, excepto estos rasgos generales, pocas



características más comparten con el resto de RAPGs. De hecho, el porcentaje más alto de homología de secuencia con los mGluRs se ha descrito para el RCa, y tan sólo alcanza el 30% (Brown y cols., 1993; Conn y Pin, 1997).

Con respecto a los miembros de su clase, los mGluRs comparten que su capacidad de unión al

ligando reside en el dominio extracelular, por lo que algunos autores también incluyen en esta clase III varios receptores de odorantes y del gusto, mientras que el resto de RAPGs unen el ligando en un "bolsillo" formado por residuos integrantes de las hélices transmembrana (Jingami y cols., 2003).

Además de la forma de unión al ligando, algunos miembros de la clase III presentan 19 residuos de cisteína conservados en la región extracelular. Esta estructura supone una organización común entre los mGluRs y el RCa (Brown y cols., 1993; Pin y Duvoisin, 1995; Jingami y cols., 2003), que como veremos más adelante, es importante en los procesos de dimerización y activación del receptor.

Las proteínas *G* acopladas a estos receptores son proteínas heterotriméricas formadas por las subunidades  $G\alpha$  (45-47 kDa),  $G\beta$  (35-37 kDa) y  $G\gamma$  de (7-9 kDa)

(Hamm y Gilchrist, 1996). La unión del agonista es seguida por un cambio de conformación del receptor que facilita la activación de la proteína *G* disparando el intercambio *GTP-GDP* en la subunidad  $G\alpha$  (Moepps y Fagni, 2003). En función de las características de la subunidad  $G\alpha$ , las proteínas *G* han sido agrupadas en cuatro familias: *Gs*, *Gi/o*, *Gq* y *G12*. Mientras que las proteínas *Gs* (estimuladora) y *Gi/o* (inhibidora) están implicadas en la regulación de la adenilato ciclasa y de canales iónicos, las proteínas *Gq* activan la fosfolipasa  $C\beta$ . Las proteínas *G12* están relacionadas con el acoplamiento de los RAPGs a la activación de las *GTP*-asas Rho (Moepps y Fagni, 2003).

## 5. LA CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO

Hasta la fecha se han identificado 8 subtipos de mGluRs (mGluR1-8). Posteriormente se han descrito diferentes isoformas por *splicing* alternativo, fundamentalmente para el extremo carboxi-terminal en algunos de ellos (Tanabe y cols., 1992; Pin y cols., 1992; Minakami y cols., 1994; Iversen y cols., 1994; Flor y cols., 1997).

Todos ellos son proteínas largas, de entre 854 y 1199 aminoácidos, con un extremo amino-terminal de aproximadamente 500 aminoácidos, donde se encuentra la secuencia de un posible péptido-señal que, junto con secuencias consenso para glicosilación, indican su naturaleza extracelular. A continuación, siete segmentos hidrofóbicos, muy cercanos entre sí, que constituyen los dominios helicoidales transmembranales, que quedan unidos por horquillas intra y extracelulares (fig. 6).

Las regiones más conservadas entre los diferentes subtipos, corresponden a: i) un segmento hidrofóbico en el dominio extracelular, que constituiría el dominio de unión a ligando y las zonas que rodean a este fragmento, ii) un grupo de 21 residuos de cisteínas, que están principalmente distribuidas en el dominio amino-terminal (19 de éstos) o en las horquillas extracitoplasmáticas, que forman puentes disulfuro y dirigen su conformación tridimensional, así como en la posibilidad de dimerización de

algunos mGluRs, iii) las horquillas intracitoplasmáticas i1 e i3, que posiblemente estén implicados en la unión a proteína G, y iv) el séptimo fragmento transmembranal (Romano y cols., 1995, 2001; Tsuji y cols., 2000)

Por su parte, el extremo carboxi-terminal, intracelular, con varias secuencias consenso de fosforilación, es variable en cuanto a longitud y es, probablemente la región menos conservada en la familia.

La clasificación de los mGluRs (fig. 7) se realizó en función del grado de homología de sus secuencias, los mecanismos de transducción de señales y el perfil farmacológico. De este modo se han definido tres grupos: I, II y III, con una homología del 70% entre los miembros del mismo grupo, bajando a un 45% cuando se trata de homología intergrupo (Nakanishi, 1992; Nakanishi y Masu, 1994; Pin y Duvoisin, 1995; Conn y Pin, 1997; Alagarsamy y cols., 2001; De Blasi y cols., 2001; Coutinho y Knopfel, 2002; Gerber y cols., 2007).

CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLUTAMATO METABOTRÓPICOS				
GRUPO	AGONISTA	EFECTOR	SUBTIPO	
GRUPO I	3,5-DHPG	+ PLC	RGlum 1	Houamed y cols., 1991
			RGlum 5	Abe y cols., 1992
GRUPO II	2R,4R,-APDC	- AC	RGlum 2	Tanabe y cols., 1992
			RGlum 3	Tanabe y cols., 1993
GRUPO III	L-AP4	- AC	RGlum 4	Iversen y cols., 1994
			RGlum 6	Nakajima y cols., 1993
			RGlum 7	Okamoto y cols., 1994
			RGlum 8	Duvoisin y cols., 1995

Figura 7.- Esquema de la clasificación de los receptores metabotrópicos de glutamato.

Los receptores del grupo I (que incluye los tipos mGluR1 y mGluR5) están acoplados preferentemente, aunque no exclusivamente, a proteínas G del tipo Gαq/11 que provocan incrementos en la concentración intracelular de IP3 y, secundariamente,

la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular por activación de la fosfolipasa C (Masu y cols., 1991; Abe y cols., 1992; Aramori y Nakanishi, 1992; Tanabe y cols., 1992; Conn y Pin, 1997). No obstante, se ha detectado el acoplamiento a otros mecanismos de señalización intracelular que incluyen, por ejemplo, mecanismos en los que está implicado AMPc (Hermans y Challiss, 2001).

Los mGluRs de los grupos II (mGluR2 y mGluR3) y III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) están primariamente acoplados a proteínas G del tipo  $G\alpha_i$  y ambos grupos de receptores se encuentran acoplados negativamente a la adenilato ciclasa, aunque cada grupo muestra propiedades farmacológicas diferentes (Conn y Pin, 1997; Bordi y Ugolini, 1999).

Los miembros de cada uno de los grupos de mGluRs pueden ser identificados en localización pre- o postsináptica. No obstante, mientras los integrantes de los grupos II y III se encuentran principalmente en lugares presinápticos, donde actúan regulando la tasa de liberación de neurotransmisor (Libri y cols., 1997; Cartmell y Schoepp, 2000; Alagarsamy y cols., 2001), los mGluRs del grupo I se encuentran, casi exclusivamente, en el elemento postsináptico (Luján y cols., 1996; 1997; Libri y cols., 1997; Shigemoto y cols., 1997; Jaarsma y cols., 1998), donde frecuentemente participan regulando la excitabilidad neuronal (Bordi y Ugolini, 1999; Gerber y cols., 2007).

La importancia diferencial de los receptores del grupo I reside en que, a través del uso de agonistas específicos, se ha demostrado que estos receptores ejercen múltiples y muy variados efectos, desde la activación de canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  y de canales catiónicos no-selectivos, hasta la potenciación de las respuestas mediadas por receptores NMDA, la inhibición o potenciación de las respuestas de receptores AMPA, la regulación de canales de  $Ca^{2+}$  y su propia autorregulación. De este modo, la activación de estos receptores conducirá, no sólo a la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos intracelulares, sino también a un incremento de la entrada de  $Ca^{2+}$  mediado por la despolarización. Estos efectos son críticos en la inducción de los fenómenos de plasticidad neural (Pin y Bockaert, 1995), y de ahí, en cierta medida, la importancia de los mGluRs del grupo I.

Los mGluRs del grupo I también presentan algunas características

estructurales que no comparten con los demás grupos. Sólo los miembros del grupo I (aunque no todos) son los únicos que presentan un dominio carboxi-terminal muy largo (fig. 8 y 9), y dado que es este dominio el de unión al efector que va a desencadenar la respuesta intracelular, probablemente sea responsable, al menos en parte, de las diferencias funcionales del grupo I con el resto de mGluRs (Nakanishi, 1992; Bockaert y cols., 1993; Pin y Duvoisin, 1995; Fagni y cols., 2004).

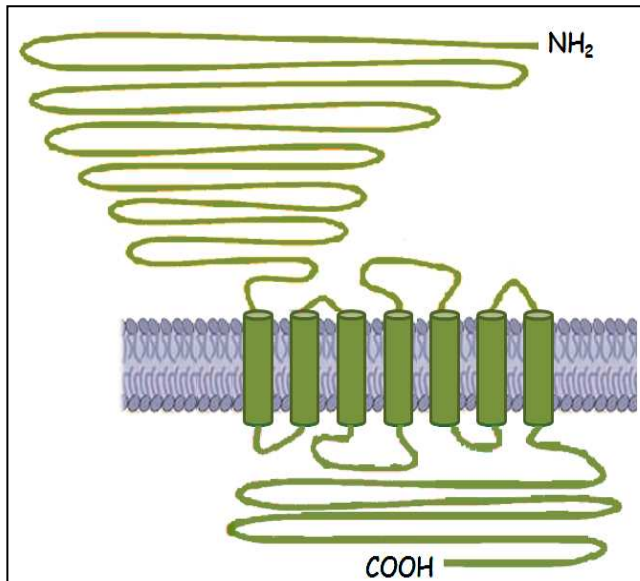


Figura 8.- Esquema representativo de la estructura del prototipo de mGluR del grupo I, que a diferencia del resto de los miembros de los grupos II y III pueden presentar un extremo carboxilo terminal considerablemente largo.

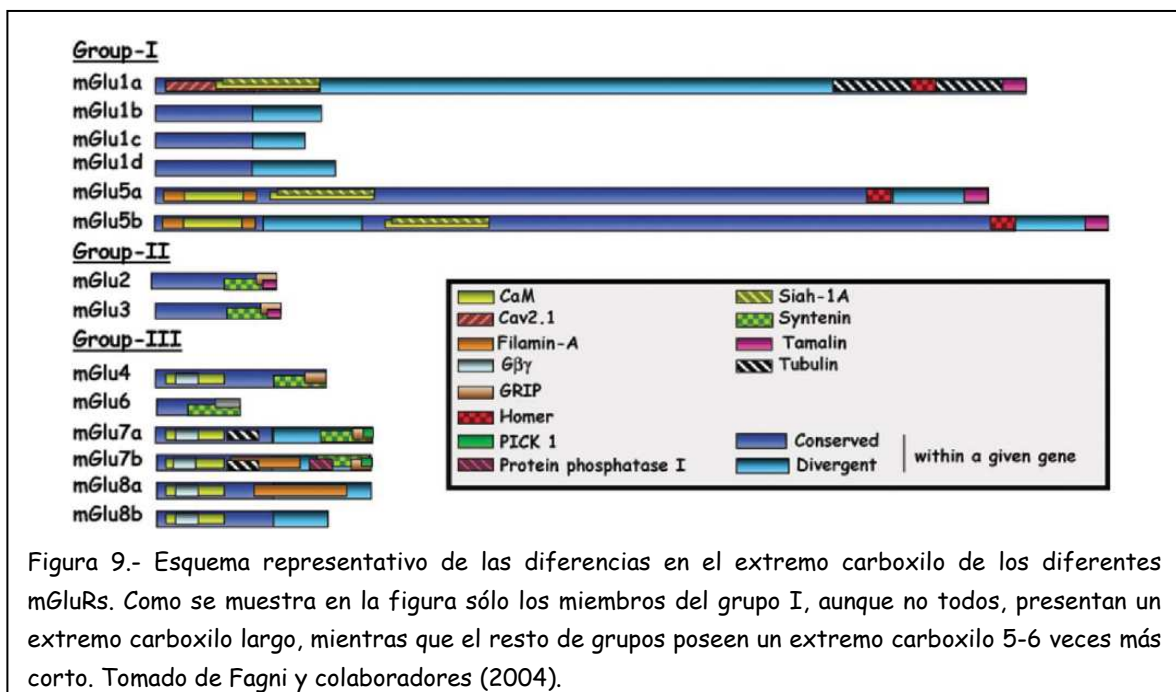


Figura 9.- Esquema representativo de las diferencias en el extremo carboxilo de los diferentes mGluRs. Como se muestra en la figura sólo los miembros del grupo I, aunque no todos, presentan un extremo carboxilo largo, mientras que el resto de grupos poseen un extremo carboxilo 5-6 veces más corto. Tomado de Fagni y colaboradores (2004).

Ya que este extremo carboxilo contiene los dominios de unión a proteínas es también responsable de la diferencia entre los mGluRs del grupo I y los otros grupos,



en cuanto a la unión de determinados ligandos que intervienen en los mecanismos de señalización en la sinapsis (Fagni y cols., 2004). Sólo los mGluRs del grupo I son capaces de unirse a las proteínas adaptadoras de la familia Homer, que como veremos más adelante intervienen en el tráfico de estos receptores a la superficie celular y además de estar implicados en otros aspectos funcionales (De Bartolomies y Iasevoli., 2003).

## 6. LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO DEL GRUPO I

El grupo I lo conforman el mGluR1 y el mGluR5, los cuales presentan, además, algunas variantes por *splicing* alternativo (al menos 4 tipos para el mGluR1 y 2 para el mGluR5) (Shigemoto y cols., 1993; Baude y cols, 1997; Shigemoto y cols, 1997). Estos receptores del grupo I actúan estimulando la fosfolipasa C, dando como resultado un aumento de IP3 y la liberación de  $Ca^{2+}$  de los reservorios intracelulares (Conn y Pin, 1997) aunque, en algunos casos, pueden acoplarse a la adenilato ciclasa (Aramori y Nakanishi, 1992). De hecho, estudios complementarios demostraron que la producción de IP3, inducida por agonistas, es sensible a la toxina botulínica en algunas células (Nicoletti y cols, 1988), mientras que es insensible en otras (Sladeczek y cols, 1985) datos que indicarían que, en su entorno natural, estos receptores podrían acoplarse a proteínas G tanto del tipo Gi/Go como del tipo Gq.

Aunque su expresión fundamentalmente tiene lugar en el SNC, los mGluRs del grupo I también se expresan en terminales de aferentes sensoriales amielínicos de la piel, donde juegan un papel importante en la sensación dolorosa (Bhave y cols., 2001). También se ha descrito su expresión en melanocitos (Frati y cols., 2000), osteoblastos (Gu y Publicover, 2000), cardiomiocitos (Gill y cols., 1999), y hepatocitos (Storto y cols, 2000).

En el SNC su expresión suele ser diferente y normalmente complementaria (Bordi y Ugolini, 1999). Así, mientras mGluR5 se expresa abundantemente en el córtex, el estriado y el núcleo accumbens de los ganglios basales y en las células

piramidales de la CA1 del hipocampo, el mGluR1 tiene sus mayores niveles de expresión en las células piramidales de la CA3 del hipocampo, las células de Purkinje del cerebelo, y el bulbo olfatorio, región objeto de nuestro estudio. Es por ello que nos centraremos en la descripción de las características del mGluR1.

Funcionalmente, existen evidencias que sugieren que los mGluR1 y mGluR5 ejercen efectos opuestos. En presencia de determinados agonistas selectivos el mGluR1 provoca despolarización ejerciendo efectos excitatorios, mientras que el mGluR5 tiene un papel inhibitorio ya que induce hiperpolarización (Guerineau y cols., 1994; Takeshita y cols., 1996; Heinbockel y cols., 2007b; Jian y cols., 2010).

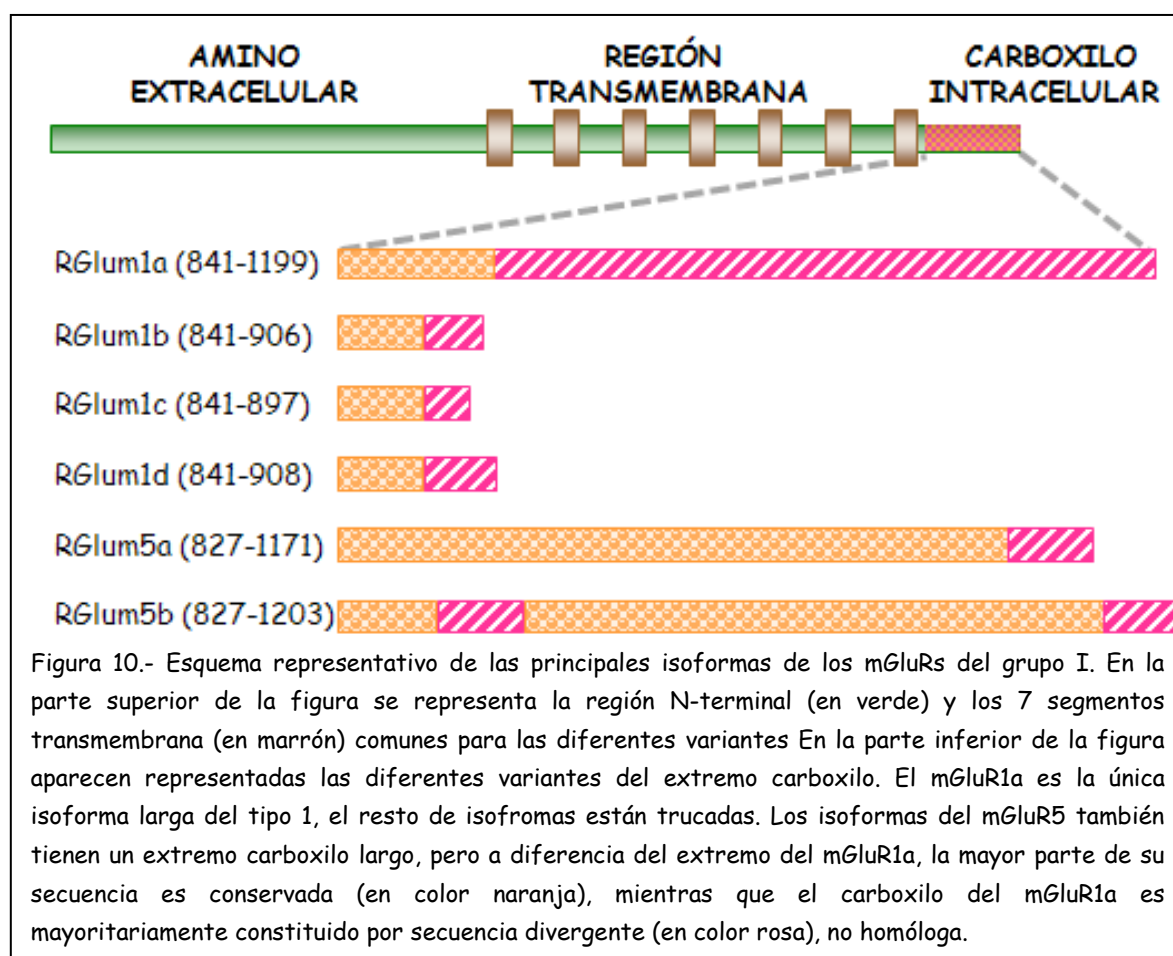
## 7. EL RECEPTOR METABOTRÓPICO DE GLUTAMATO TIPO 1

Se han identificado diversas variantes de *splicing* que generan diferentes isoformas de mGluR1 (fig. 10). La primera de ellas en ser clonada fue denominada mGluR1 $\alpha$  o mGluR1a (Houamed y cols, 1991; Masu y cols, 1991). Posteriormente se han identificado nuevas isoformas, aunque en algunos casos, no hay evidencias claras para asegurar la existencia real de algunas de éstas (Ferraguti y cols., 2008).

La isoforma mGluR1a, conocida como isoforma larga, está compuesta por un péptido de 1.199 aminoácidos, con una masa molecular de 133 kDa. La proteína tiene tres dominios estructurales, un dominio amino-terminal de 593 aa y un dominio carboxi-terminal de 367 aa, separados ambos por un dominio central de 239 aa que contiene los siete dominios transmembrana (Houamed y cols, 1991 y Masu y cols, 1991).

La isoforma mGluR1 $\beta$  (o mGluR1b) presenta un extremo carboxi-terminal delecionado (Tanabe y cols, 1992). Deriva de dos diferentes transcritos, denominados mGluR1 $\beta_1$  y mGluR1 $\beta_2$  (anteriormente mGluR1f) generados por *splicing* alternativo. En estos casos se produce la inserción de un exón de 85 pb posterior a los 7 dominios transmembrana (Tanabe y cols., 1992) que incluye un codón de terminación. De este modo se produce la sustitución de los últimos 318 aa del mGluR1a por sólo 20 residuos, originando así una proteína de 906 aa con un dominio intracelular

corto. La isoforma RMGlu1 $\beta_2$  (Soloviev y cols., 1999) se produce por la inserción del mismo exón que en el caso anterior, con alguna variación postranscripcional adicional.



Se han descrito otras formas de mGluR1 caracterizadas por presentar también un extremo carboxi-terminal corto. Una isoforma denominada inicialmente mGluR1d (Laurie y cols., 1996), actualmente denominada mGluR1 $\gamma$ , que deriva de una pequeña variación en el *splicing* del mGluR1 $\beta_2$  originando un receptor de 908aa.

La isoforma mGluR1c fue aislada de una librería de cDNA de cerebelo de una rata (Pin y cols., 1992) y se pensó que derivaría de un *splicing* alternativo de un exón insertado tras los 7 dominios transmembrana, y que daba lugar también a otra forma de receptor con extremo carboxi-terminal corto. Sin embargo no se encontraron similitudes entre la secuencia del mGluR1c y la genoteca de rata, lo que sugiere que esta "supuesta" variante del mGluR1 derivaría de un evento de recombinación producido en la propia librería de cDNA.

Otra isoforma denominada mGluR1g (Makoff y cols., 1997) ha sido clonada de una librería de cDNA del cerebelo humano que da lugar a una proteína de 887 aa. A pesar de haber localizado esta isoforma también en riñón, los propios autores no descartan la posibilidad de que los transcritos subclonados de mGluR1g puedan derivar de un pre-mRNA parcialmente procesado.

Ha sido también identificada, en ratón, una variante de *splicing* más, que se denominó inicialmente mGluRE55 (Zhu y cols., 1999) y actualmente mGluR1δ. El transcrito genera una proteína truncada de 321 aa que sólo contiene parte del dominio extracelular, por lo que podría tratarse de una proteína de secreción.

El hecho de que el mGluR1a posea un extremo carboxi-terminal largo establece unas claras diferencias respecto a las otras isoformas. Estas diferencias incluyen la existencia de dominios adicionales que le permiten la interacción con diversos elementos integrantes de las rutas de señalización, lo cual le confiere capacidades particulares respecto al resto de isoformas.

### **LA ISOFORMA $\alpha$ DEL RECEPTOR: mGluR1 $\alpha$**

La longitud del dominio carboxi-terminal en las diferentes isoformas del mGluR1 determina las diferencias en cuanto a las propiedades de señalización (Pin y Duvoisin, 1995) y en su localización subcelular en neuronas (Ferraguti y cols., 1998). Así, aunque todas las variantes del mGluR1 activan la fosfolipasa C, las señales intracelulares de calcio generadas por los receptores de extremo carboxi-terminal corto tienen cinéticas más lentas (Pin y Duvoisin, 1995). Por otra parte, mientras que la distribución de mGluR1a es típicamente somatodendrítica, en la periferia de la densidad postsináptica (Baude y cols., 1993; Pin y Bockaert, 1995), las isoformas cortas se presentan, principalmente, en elementos presinápticos (Fotuhi y cols., 1993; Pin y Bockaert, 1995).

Además, la presencia de este extremo carboxi-terminal largo confiere al mGluR1a toda una serie de lugares de interacción para muy diversas proteínas que determinan algunas de sus propiedades funcionales. Así, este extremo presenta una secuencia de lugares de fosforilación Serina/Treonina (Masu y cols., 1991), sobre las

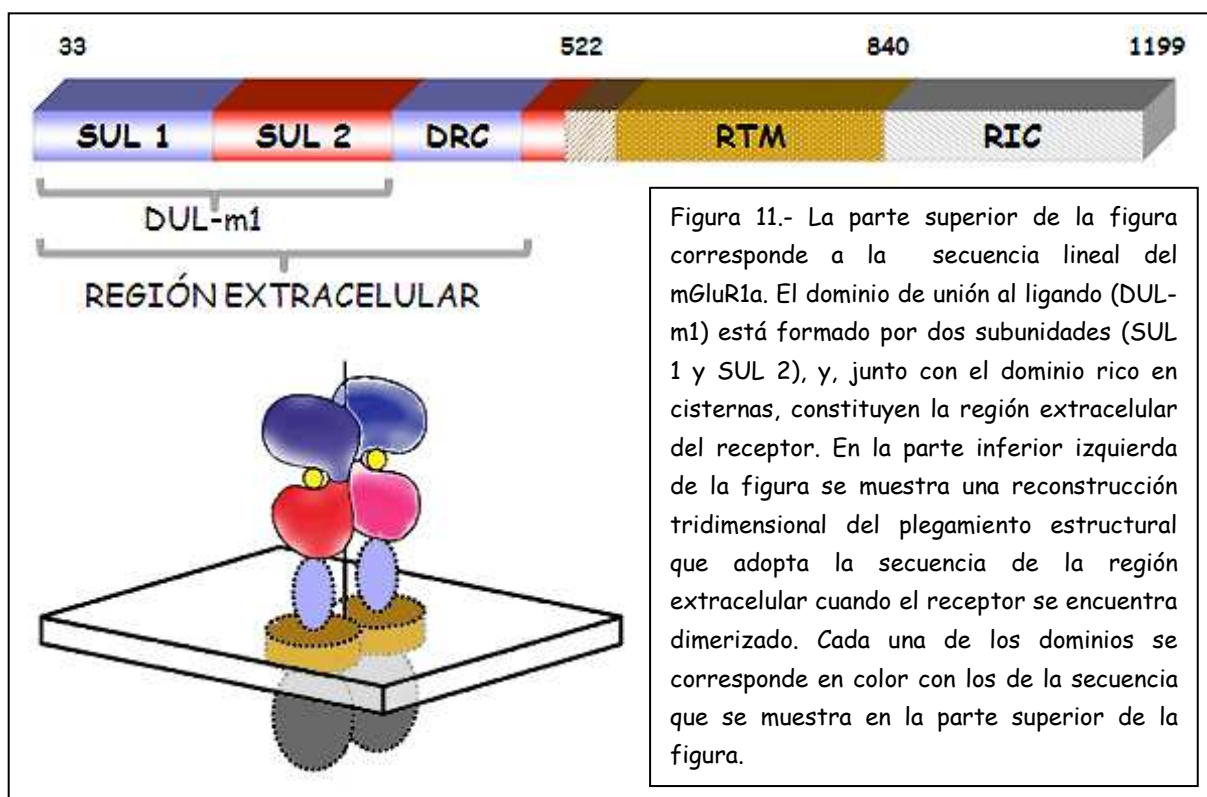
que actúa PKC (proteín kinasa C) en un proceso decisivo para su desensibilización (Francesconi y Duvoisin, 2000). También presenta una secuencia PPSFR, que no está presente en otras isoformas, y que es capaz de interactuar con las proteínas de la familia Homer, al igual que otras secuencias consenso sobre las que interactúan proteínas del andamiaje postsináptico como PSD-95 (Tu y cols., 1998, 1999), así como dos sitios de unión para calmodulina (Ishikawa y cols., 1999).

### **DIMERIZACIÓN DEL mGluR1a**

A mediados de los años 70 aparecieron las primeras evidencias que indujeron a pensar en la posibilidad de que los RAPGs puedan actuar como complejos diméricos (Limbird y cols, 1975; Wreggett y Wells, 1995). Pero no fue hasta mediados de los 90 cuando esta teoría tomó fuerza con el estudio de diferentes RAPGs (Maggio y cols., 1993; Hebert y cols, 1996; Bai y cols., 1998; Bouvier, 2001). La mayoría de receptores de membrana funcionan como dímeros en la superficie celular. Éste también es el caso del mGluR1a. Los estudios de Romano y colaboradores (1996a) demostraron que mGluR1a existe como homodímero en la membrana plasmática. El dominio amino-terminal de mGluR1a está compuesto por un dominio de unión al ligando (DUL-m1) y por un dominio rico en cisteínas (DRC) (Jingami y cols., 2003; Kniazeff y cols., 2004). El dímero se forma por la unión covalente, a través de puentes disulfuro, que se establecen entre residuos de cisteínas presentes en el DRC (fig. 11).

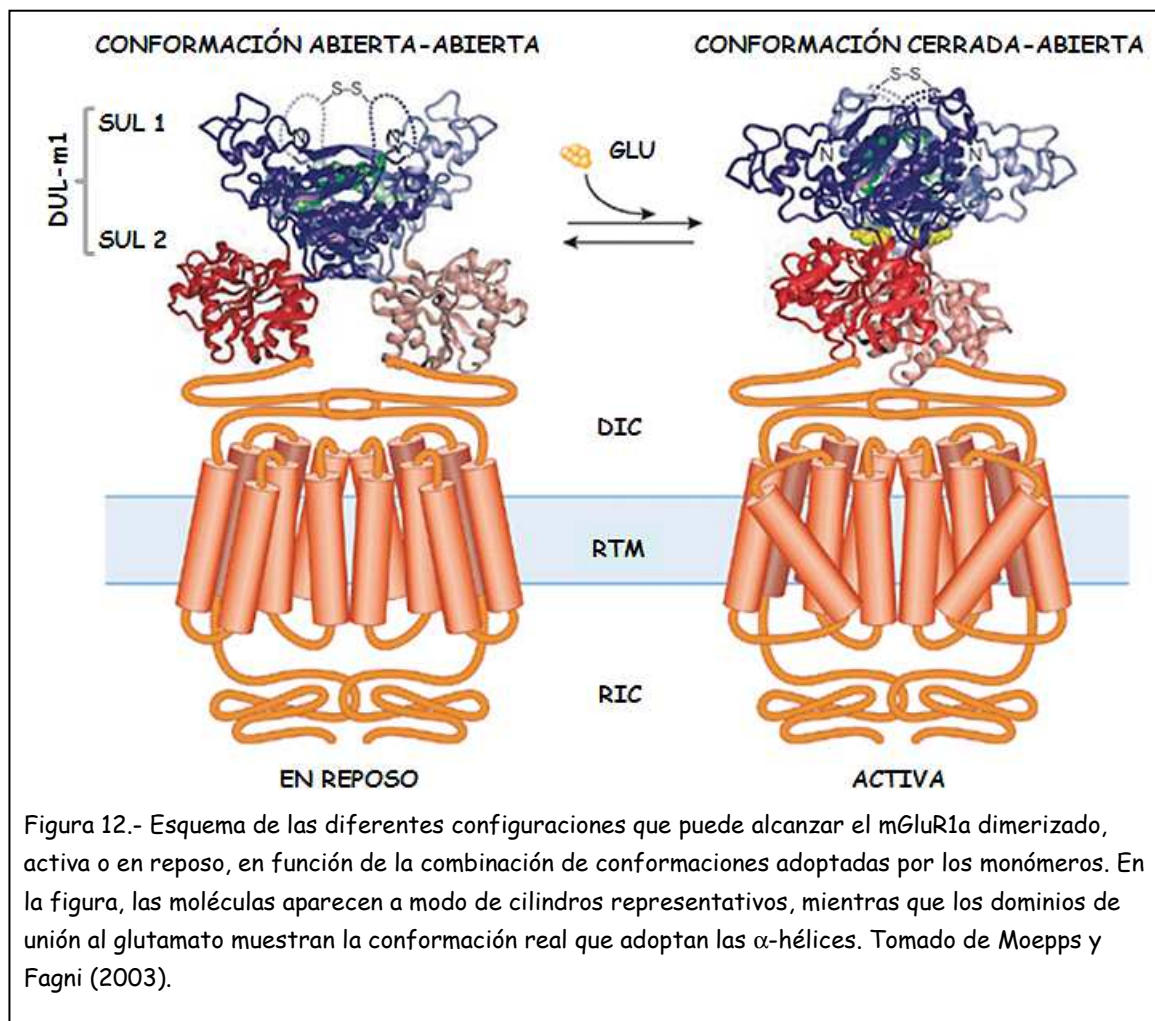
La dimerización parece tener lugar en el retículo endoplasmático (Hermans y Challiss, 2001) y es crucial en la activación del receptor y por tanto jugará un papel clave en su capacidad de señalización (Romano y cols., 1996a; Sato y cols., 2003). Las primeras evidencias que indicaban que las formas diméricas son críticas para el mantenimiento de la transducción de la señal fueron aportadas por los estudios realizados por Vignes y colaboradores (1992). Estos autores demostraron que la producción de IP3 estimulada por glutamato es bloqueada bajo condiciones reductoras, que rompen los puentes disulfuro, inestabilizando así los dímeros. Estudios posteriores, a través de mutagénesis puntual en la secuencia aminoacídica

del receptor, corroboraron esta relación entre la unión del ligando al dímero y la transducción de la señal glutamatérgica (Sato y cols., 2003).



En conjunto, los diferentes estudios realizados sobre la dimerización del receptor no sólo concluyen que la capacidad de dimerización del mGluR1a reside en el extremo amino-terminal, y que en ella es decisiva la cisteína localizada en la posición 140, aunque parece que también participan uniones no covalentes (Ray y Hauschild, 2000), sino que, además, descartan la formación de heterodímeros entre mGluR1a y otros tipos de mGluRs (Romano y cols., 1996a, b; Robbins y cols., 1999; Jingami y cols., 2003).

Por su parte, el DUL-m1 presenta dos secuencias de unión al ligando (SUL 1 y SUL 2), que forman una estructura bilobulada, adoptando la morfología de una "doble concha" (Kunishima y cols., 2000; Tsuchiya y cols., 2002; Kniazeff y cols., 2004). El DUL-m1 puede alcanzar una configuración "cerrada" o "abierta", y dependiendo de la combinación de estas configuraciones se mantiene o no la capacidad de estabilizar la interacción con el glutamato cuando se produce la dimerización (fig. 12) (Jingami y cols., 2003).



Estudios cristalográficos han descrito dos posibles conformaciones en los dímeros del receptor, denominadas A (*activated*) y R (*resting state*), dependiendo de la configuración que adopta el promotor de cada monómero y de la interfase dimérica, que queda definida por las interacciones entre los promotores que dimerizan (fig. 12) (Jingami y cols., 2003; Sato y cols., 2003).

-la conformación A se alcanza cuando dimerizan un promotor en conformación cerrada y el otro en conformación abierta (cerrado-abierto/A), y corresponde a la forma dimérica del receptor unido a glutamato.

-la conformación R se define por la interacción de dos promotores abiertos (abierto-abierto/R). Esta conformación dimérica corresponde tanto al receptor no ligado a glutamato como a la forma unida a antagonistas del glutamato.

Se supone que ambas conformaciones se encuentran en un estado de equilibrio dinámico en ausencia de ligando, que se desplaza a favor de la conformación A cuando se produce la unión del glutamato, estabilizando el estado activo del receptor (Jingami y cols., 2003).

## EL mGluR1 $\alpha$ EN EL ELEMENTO POSTSINÁPTICO DE LA SINAPSI GLUTAMATÉRGICA

El elemento más llamativo del elemento postsináptico está constituido por la densidad postsináptica (PSD), una estructura electrodensa altamente especializada y subyacente a la membrana postsináptica de las sinapsis excitatorias. La densidad postsináptica contiene todo tipo de moléculas que están involucradas en la transducción de señal así como en la plasticidad sináptica (Boeckers y cols, 2002). La alta diversidad proteica de esta región precisa de un elevado grado de estructuración que se consigue gracias a la presencia de una serie de proteínas adaptadoras (*scaffolding proteins*). Uno de los casos más notables de proteínas adaptadoras lo encontramos en las proteínas de la familia Shank, unas proteínas que juegan un papel primordial en la organización de las sinapsis glutamatérgicas ya que median la interacción de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato. Éstas son proteínas de gran tamaño y formadas por una gran variedad de dominios que median interacciones proteína-proteína. Un miembro prototípico de la familia Shank contiene, entre otros, múltiples dominios ANK (*ankyrin repeats*), seguidos por un dominio SH3 (*Src homology 3*) un dominio PDZ (PSD-95/DLG/ZO1) y un dominio rico en prolina (Boeckers y cols, 2002; Sheng y Kim, 2000).

Los dominios PDZ son característicos de una amplia familia de proteínas que les permiten la interacción con toda una serie de proteínas que contienen secuencias de aminoácidos específicas. En la densidad postsináptica de sinapsis glutamatérgicas las proteínas PDZ juegan un importante papel en la organización y ensamblaje de complejos supramoleculares de señalización, posibilitando, por ejemplo, las uniones



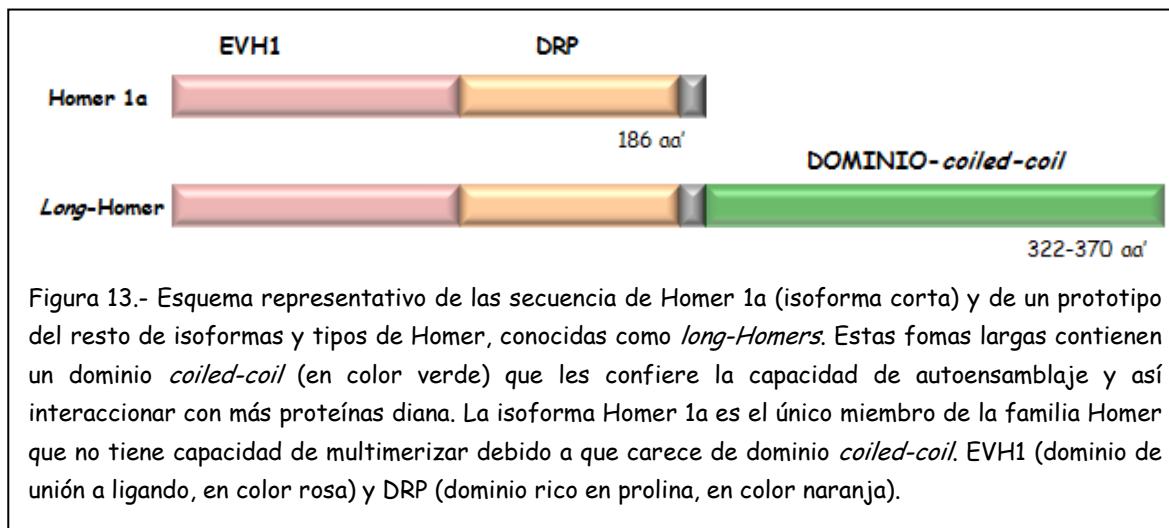
entre receptores de superficie, canales iónicos y otros elementos participantes en la transducción de la señal (Gerber y cols., 2007; Scannevin y Huganir, 2000).

A través del dominio PDZ de Shank se produce la interacción con GKAP (*guanylate-kinase-associated protein*), una proteína que une la proteína PSD-95, la cual, a su vez, une los receptores de glutamato NMDA y kainato, sirviendo, pues, de puente entre estos receptores y Shank (Boeckers y cols, 2002; Kreienkamp, 2002a, b). La región rica en prolina permite la interacción de Shank con el dominio EVH1 (*Ena/VASP homology 1*) de la proteína Homer, una proteína que al igual que Shank también interacciona directamente con mGluR1a (Kreienkamp, 2002a, b). Esto permite agrupar en un mismo complejo tanto a los receptores ionotrópicos como metabotrópicos de glutamato.

Como se ha comentado anteriormente, otra proteína con un papel fundamental en la organización de la densidad postsináptica es la PSD-95 (*postsynaptic density protein 95*). La PSD-95 pertenece a la familia de proteínas conocidas con el nombre de MAGUKs (*membrane-associated guanylate kinases*), capaz de oligomerizar y agrupar canales iónicos y la maquinaria de señalización asociada a las sinapsis excitatorias del SNC.

mGluR1a presenta una disposición muy constante en la membrana postsináptica, rodeando al núcleo central de receptores ionotrópicos (Luján y cols., 1996). La cuestión de su localización tan específica se resolvió con la identificación del primer miembro de una nueva familia de proteínas denominadas Homer (o Ves1) denominado (Homer1a) (Brakeman y cols., 1997; Soloviev y cols., 2000). A éste le siguió la clonación de otros genes (Homer1-Homer3) que hasta la fecha han dado lugar a 16 isoformas diferentes de proteínas Homer (Soloviev y cols., 2000; Fagni y cols., 2000; De Bartolomeis y Iasevoli, 2003; Shiraishi-Yamaguchi y Furuichi, 2007). Estas proteínas Homer poseen un dominio similar al PDZ, y otro, similar al EVH1, que es capaz de interaccionar con una región distal del extremo carboxi-terminal del mGluR1a, rica en prolina (PPXXFR), (Tu y cols., 1998) y que no está presente en los mGluRs de extremo carboxi-terminal corto.

Las proteínas Homer contienen un único dominio EVH1 en su extremo amino-terminal, y por tanto, les permitiría un único punto de unión con otros elementos. Pero además, la mayoría de sus isoformas también contienen un dominio *coiled-coil* en su extremo carboxi-terminal que les permite oligomerizar (fig. 13) (Xiao y cols., 1998; Tadokoro y cols., 1999; Soloviev y cols., 2000; De Bartolomeis y Iasevoli, 2003).



Esta asociación es crucial para la formación de complejos homo- y heteromultimerizados de Homer, y por tanto, la posibilidad de poner en relación varios elementos a la vez. De hecho se ha demostrado que los dímeros, incluso tetrámeros, de Homer interconectan el mGluR1a con receptores de IP3 y así se coordina la maquinaria de generación de IP3 y la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo endoplasmático (Tu y cols., 1998; De Bartolomeis y Iasevoli, 2003).

Aunque los papeles específicos de las diferentes isoformas de Homer no están excesivamente claros, parece que, además de sus funciones de anclaje, regulando o facilitando el *cross-talk* entre proteínas diana, las proteínas Homer también pueden funcionar como chaperonas, de modo que afectan al nivel de expresión de mGluR1a en la superficie celular (Ciruela y cols., 1999; Roche y cols., 1999), e igualmente a su localización subcelular y su anclaje a membranas intracelulares. Así la expresión en superficie de mGluR1a (y sus respuestas a la estimulación por ligando) se incrementa cuando se coexpresa con Homer1a (Ciruela y cols., 1999) o Homer1c (Ciruela y cols., 2000), mientras que la coexpresión de Homer1b/c provoca la retención del receptor

en el retículo endoplásmico, y consecuentemente una disminución de su expresión en superficie (Roche y cols., 1999) lo que supondría un sistema de regulación de su actividad.

De entre todas los Homer, Homer1a, es la única isoforma que no posee el dominio *coiled-coil* por lo que no puede oligomerizar con otros Homer (fig. 13). Otra diferencia respecto al resto de isoformas es que, mientras éstas se expresan constitutivamente (Xiao y cols., 1998), Homer1a es el producto de un gen de expresión temprana, que es rápidamente inducido como respuesta a actividad neuronal intensa. La inducción de la transcripción de Homer1a determina que éste impida la capacidad de autoensamblaje de las formas largas con mGluR1a por medio del secuestro de sus ligandos. De este modo funciona como dominante negativo fisiológico, compitiendo con las formas largas de Homer, regulando así las posibilidades de ensamblaje y señalización de éstas, y eliminando la unión de mGluR1a con otras proteínas intracelulares (Xiao y cols., 1998; Tadokoro y cols., 1999, De Bartolomeis y Iasevoli, 2003). Consecuentemente este proceso altera los mecanismos de señalización intracelular (Fagni y cols., 2000), lo cual parece estar relacionado con la regulación de circuitos y sinapsis (Shiraishi-Yamaguchi y Furuichi, 2007).

En este sentido, Ango y colaboradores (2001a, b) demostraron que el aumento en la expresión de Homer1a en las neuronas granulares del cerebelo producía un incremento de las asociaciones mGluR1a-Homer1a y, como consecuencia de ello, una reducción de la asociación de mGluR1a con otros Homer y un desenmascaramiento de la actividad constitutiva de mGluR1a. En células de Purkinje, la despolarización induce la expresión de Homer1a. Esto hace que haya una mayor tasa de expresión de mGluR1a en la superficie celular, provocando un incremento de la respuesta mediada por este receptor (Minami y cols., 2003). Estos resultados indican que las formas largas y cortas de Homer regulan el direccionamiento y agrupación de mGluR1a en la superficie celular a través de acciones opuestas (Shiraishi-Yamaguchi y Furuichi, 2007).

La localización en la sinapsis de las distintas isoformas de Homer no es estática, sino altamente dinámica en respuesta a la actividad sináptica. Esto, a su vez, determinaría las interacciones existentes entre los distintos receptores y otras

moléculas implicadas en el proceso de señalización. Esta interacción dinámica, por tanto, sugiere que estas proteínas serían decisivas en procesos tales como el desarrollo y maduración sináptica (Kato y cols., 1998; Foa y cols., 2001) o en la remodelación de las sinapsis que contribuya a cambios a largo plazo en su eficacia observada en las sinapsis glutamatérgicas (Sheng, 1997; Kato y cols., 1998).

## EL SISTEMA OLFATORIO

En el cerebro humano la importancia del sentido del olfato es "relativa". Sin embargo, los roedores dependen del sentido del olfato para reproducirse y para sobrevivir. De hecho, poseen bulbos olfatorios de un tamaño relativo, respecto al resto del encéfalo, notablemente elevado (Ennis y cols., 2007).

El sistema olfatorio se compone de dos sistemas paralelos, el principal y el accesorio o vomeronasal. Estructuralmente ambos sistemas son similares, pero difieren en su finalidad. El sistema vomeronasal es especialmente sensible a feromonas (Plendl y cols., 1999) y está implicado en el comportamiento sexual, el apareamiento, el reconocimiento de la madre en el proceso de amamantamiento, el cortejo, el reconocimiento de la progenie y otros comportamientos relacionados con el sistema endocrino (Firestein, 2001). El sistema olfatorio principal está más relacionado con la identificación de predadores, la localización de alimento, el comportamiento social y la territorialidad, aunque también interviene en la reproducción (Lin y cols., 2005; Mandiyan y cols., 2005).

Las regiones en las que son captados los odorantes en estos dos sistemas se

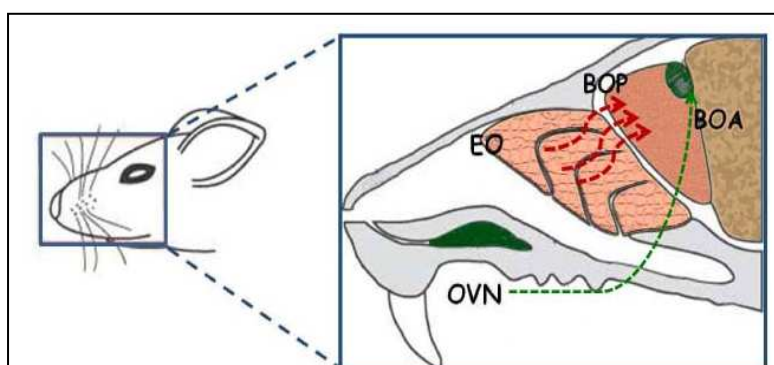


Figura 14.- Representación de la localización del sistema olfatorio de una ratona. En la cavidad nasal los odorantes son recibidos por el epitelio olfatorio (EO) que proyecta al bulbo olfatorio principal (BOP), mientras que el órgano vomeronasal (OVN), localizado en el hueso vómer entre las cavidades nasal y bucal, detecta feromonas y proyecta al bulbo olfatorio accesorio (BOA).

encuentran en dos zonas claramente delimitadas, el epitelio olfatorio y el órgano vomeronasal, donde se encuentran las neuronas receptoras olfatorias que proyectan sus axones a dos estructuras bulbares diferentes: el bulbo olfatorio principal y el bulbo olfatorio accesorio, identificando los dos

sistemas olfatorios anteriormente mencionados (fig. 14) (Cajal, 1911a, b; Mori y cols., 1999; Wachowiak y Shipley, 2006; Ennis y cols., 2007).

A grandes rasgos el sistema olfatorio principal está compuesto por el epitelio olfatorio, el bulbo olfatorio y la corteza olfatoria primaria (Cajal, 1911a; Shipley y cols., 2004; Ennis y cols., 2007). En el epitelio se produce la transducción de la señal olfatoria, en los bulbos tiene lugar un primer procesado y la modulación de la misma y en la corteza se produce la integración de la información sensorial (Shepherd y Greer, 1990; Mori y cols., 1999; Wachowiak y Shipley, 2006; Ennis y cols., 2007).

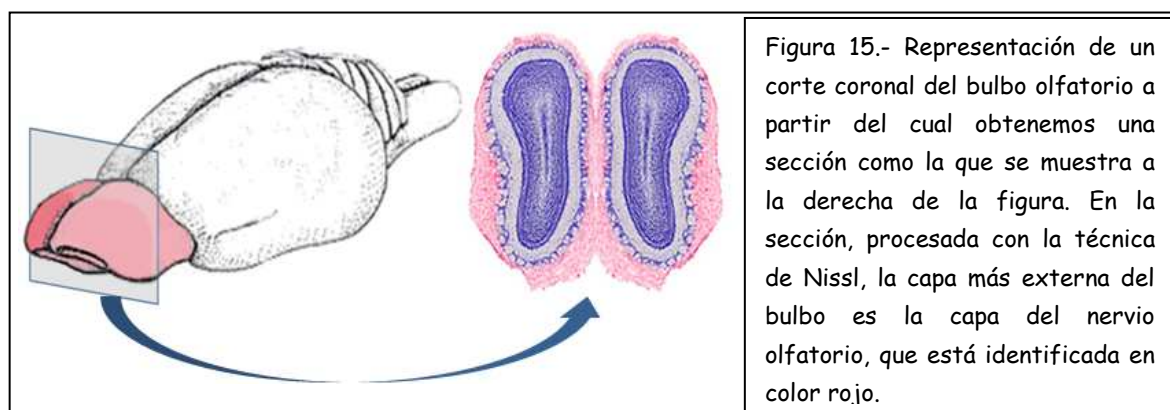
En el epitelio olfatorio de roedores se localizan entre 6 y 10 millones de neuronas receptoras olfatorias (NROs) que captan las moléculas odorantes que entran por las fosas nasales (Firestein, 2001). Las NROs extienden una serie de prolongaciones hacia la superficie luminal del epitelio en cuya membrana se sitúan los receptores olfatorios (Firestein, 2001). En el otro extremo, la NRO proyecta un único axón no ramificado y amielínico que, agrupándose con otros axones, forman el nervio olfatorio que atraviesa la placa cribiforme del hueso etmoides para alcanzar el bulbo olfatorio principal, al cual nos referiremos a partir de ahora como, simplemente, bulbo olfatorio (Cajal, 1911a; Pinching y Powell, 1971 b;c; Shipley y cols., 2004; Ennis y cols., 2007).

Los bulbos olfatorios son unas estructuras globosas, situadas en la parte rostral del cerebro. A su llegada al bulbo, la información transmitida por el nervio olfatorio es recibida por las neuronas principales del bulbo, células mitrales y empenachadas. Tras ser sometida a diferentes procesos de modulación por los circuitos bulbares, las neuronas principales dan salida a la información hacia la corteza olfatoria primaria a través de sus axones que se empaquetan formando el tracto olfatorio lateral. Desde las estructuras corticales olfatorias la información es integrada con otras funciones neurales y dirigida a otros centros encefálicos (De Olmos y cols., 1978; Shipley y cols., 2004; Ennis y cols., 2007).

## 1. ARQUITECTURA DEL BULBO OLFATORIO: DISTRIBUCIÓN DE CAPAS Y DE TIPOS NEURONALES

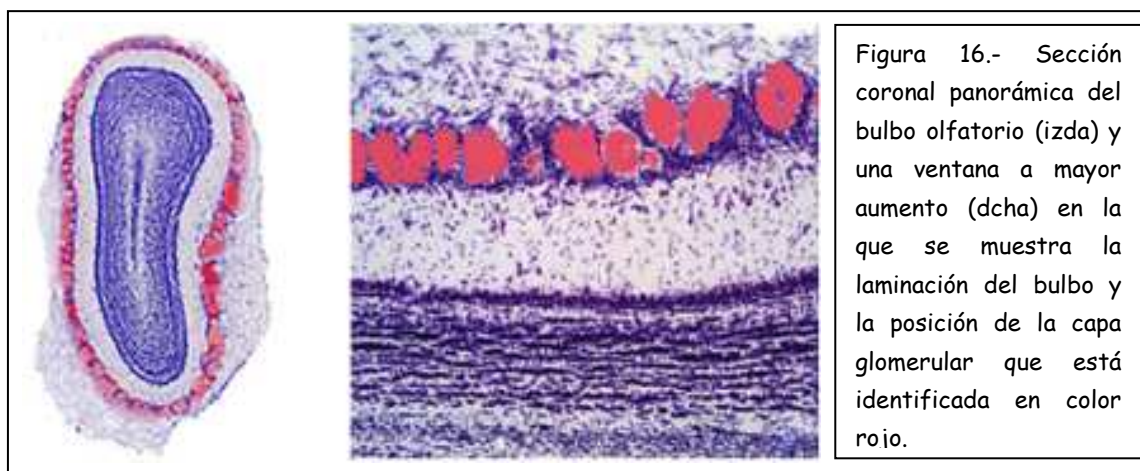
El bulbo olfatorio es una estructura paleocortical aparentemente simple, y que, como estructura cortical, presenta una organización laminar, con las capas dispuestas concéntricamente en las que se distribuyen diferentes tipos de neuronas, clasificados inicialmente atendiendo principalmente a su localización en las capas y morfología somática, y que posteriormente se ha mostrado que se corresponden, en mayor o menor medida, con particularidades fisiológicas, neuroquímicas y de conectividad

**CAPA DE FIBRAS DEL NERVI OLFATORIO (CFNO).** Es la lámina más superficial del bulbo (fig. 15) y está formada por finos axones amielínicos del nervio olfatorio que se entrelazan al llegar al bulbo ipsilateral, acompañados, además, por células gliales (Cajal, 1911a; Pinching y Powell, 1971 b; Bailey y Shipley, 1993 Shipley y cols., 2004). La transmisión de la información sensorial desde los axones del nervio olfatorio es mediada por glutamato y por tanto de carácter excitatorio (Aroniadou-Anderjaska y cols., 1997; Keller y cols., 1998).

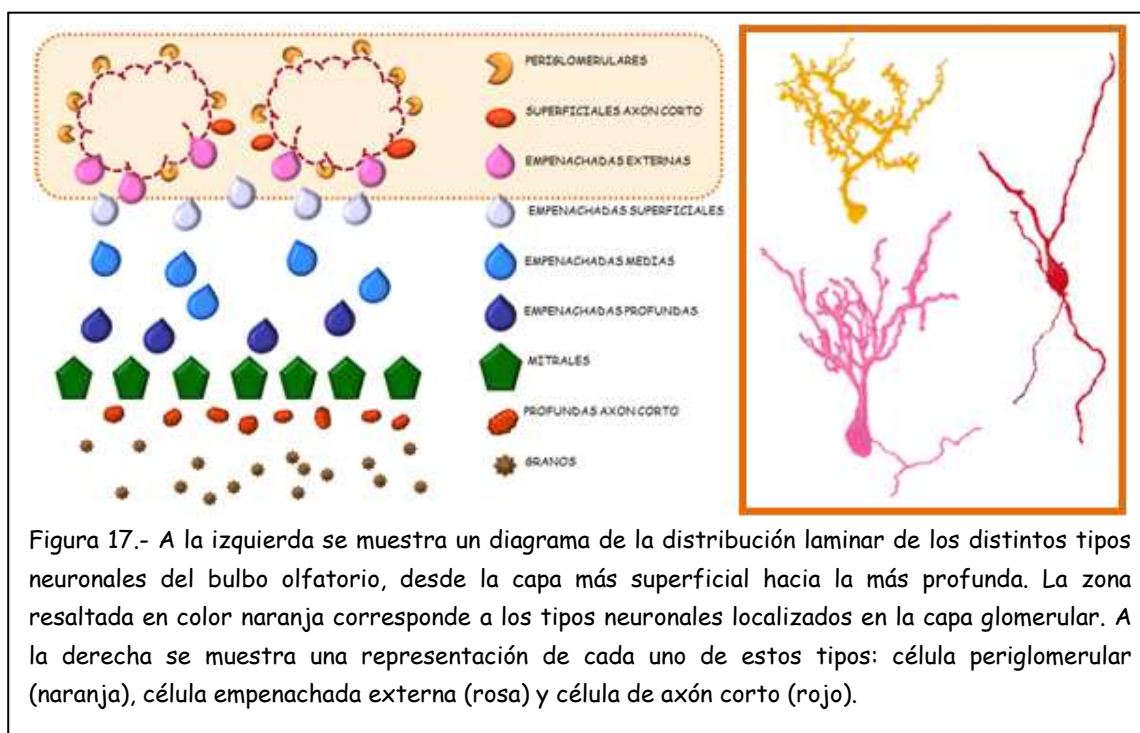


**CAPA GLOMERULAR (CGL).** Una vez que han alcanzado el bulbo, los axones del nervio olfatorio finalizan su recorrido en unas formaciones esféricas llamadas glomérulos olfatorios, que constituyen esta capa (fig. 16). Morfológicamente tienen la apariencia de ovillos de neuropilo rodeados por una capa limitante astrocítica y, funcionalmente, se consideran unidades discretas de procesamiento de información

(Lancet y cols., 1982; Shipley y cols, 1995; Hayar y cols, 2004a, b; Ennis y cols., 2007).



Las neuronas localizadas en el entorno glomerular (fig. 17) se denominan en conjunto "células yuxtglomerulares" de las que se diferencian 3 tipos: células periglomerulares (cPGs), células empenachadas externas (cEEs) y células superficiales de axón corto (cSACs) (Pinching and Powell, 1971a). Todas estas neuronas yuxtglomerulares tienen características interneuronales (Kosaka y Kosaka, 2005a; Ennis y cols., 2007).





Las cPGs son la población más numerosa de células yuxtaglomerulares; sus somas son pequeños (5-8 $\mu$ m), esféricos y se sitúan a lo largo de todo el contorno glomerular. Su árbol dendrítico está muy ramificado, con ramas cortas, irregulares y muy espinosas, y queda restringido a una región discreta del glomérulo sin invadirlo en su totalidad (Pinching y Powell, 1971a; McQuiston y Katz, 2001; Shipley y cols., 2004). La población de cPGs ha sido considerada, al igual que el resto de poblaciones celulares bulbares, bastante homogénea, pero en la última década numerosos estudios han demostrado que comparten poco más que morfología y localización, evidenciado una gran heterogeneidad en esta población, que comentaremos más adelante (Ennis y cols., 2007).

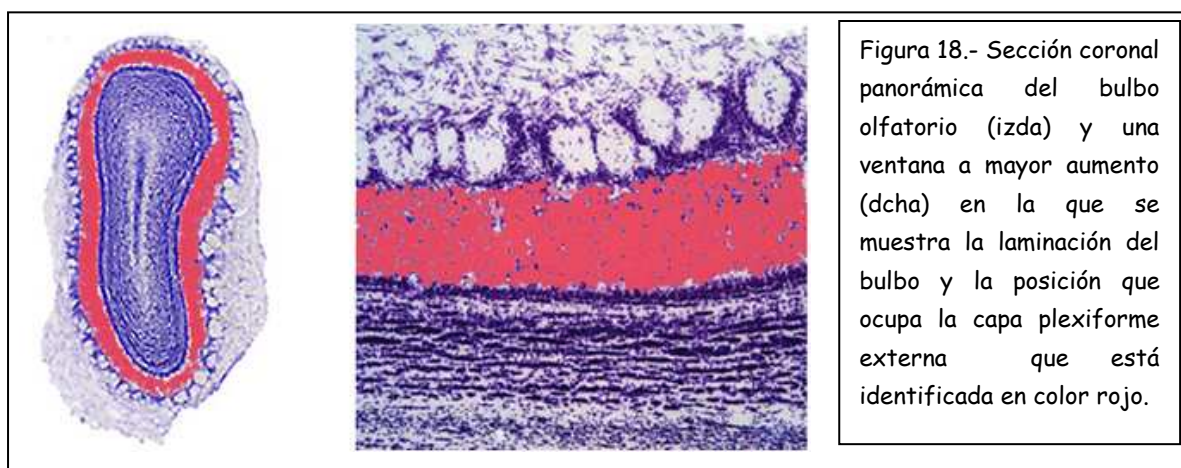
Las cSACs son algo mayores en tamaño (10-12  $\mu$ m) y tienden a localizarse en la parte profunda de los glomérulos, en el límite inferior de la CG. Sus somas suelen presentar morfología ovoide, cuyo eje mayor se encuentra orientado de forma paralela a la laminación bulbar. Las dendritas emergen desde los extremos del soma siguiendo la misma orientación, confinadas preferentemente a las zonas periféricas del glomérulo y presentan numerosas varicosidades (Pinching y Powell, 1971a; Shipley y cols., 2004). Tanto las cPG como las cSAC son poblaciones de interneuronas inhibitorias que contienen principalmente GABA (Ribak y cols., 1977) y/o dopamina (DA) (Halász y cols., 1983; Kosaka y cols., 1985; McLean y Shipley, 1988).

El tercer tipo de célula yuxtaglomerular son las cEEs, que son las de mayor tamaño somático (10-15  $\mu$ m) de la capa. Su soma es ligeramente piriforme y se distribuyen preferentemente rodeando los glomérulos por la zona más profunda de la capa. Sus ramificaciones dendríticas, normalmente lisas, ocupan una gran porción del glomérulo. A diferencia de las anteriores tienen carácter excitatorio, siendo principalmente glutamatérgicas (Aroniadou-Anderjaska y cols., 1999; Hayar y cols., 2004b; Shipley y cols., 2004).

**CAPA PLEXIFORME EXTERNA (CPE).** Se sitúa internamente a la CG (fig. 18) y está compuesta por un denso neuropilo formado por dendritas de células principales (mitrales y empenachadas) y de interneuronas localizadas en capas más profundas,

como las células grano (cGRs), mientras que la densidad de somas celulares es relativamente baja. La mayoría de los somas que encontramos en la CPE (fig. 19) pertenecen a células empenachadas (neuronas de proyección glutamatérgicas), pero también encontramos diferentes tipos de interneuronas locales. Entre ellas están las células de Van Gehuchten (Van Gehuchten and Martin, 1891), células satélite, células piriformes y células multipolares, así como células de axón corto semejantes a las que aparecen en la capa glomerular (Schneider y Macrides, 1978; Shipley y Ennis, 1996; Kratskin y Belluzzi, 2003). Todos estos tipos neuronales presentan una gran diversidad morfológica, que en ocasiones se solapa entre grupos, lo que hace muy complicada su correcta identificación. Por ello algunos autores han propuesto agruparlas (al menos bajo criterios estrictamente morfológicos) en una misma población a la que denominan "neuronas multipolares anaxónicas de la CPE" (Kosaka and Kosaka, 2008a; Kosaka y Kosaka, 2011).

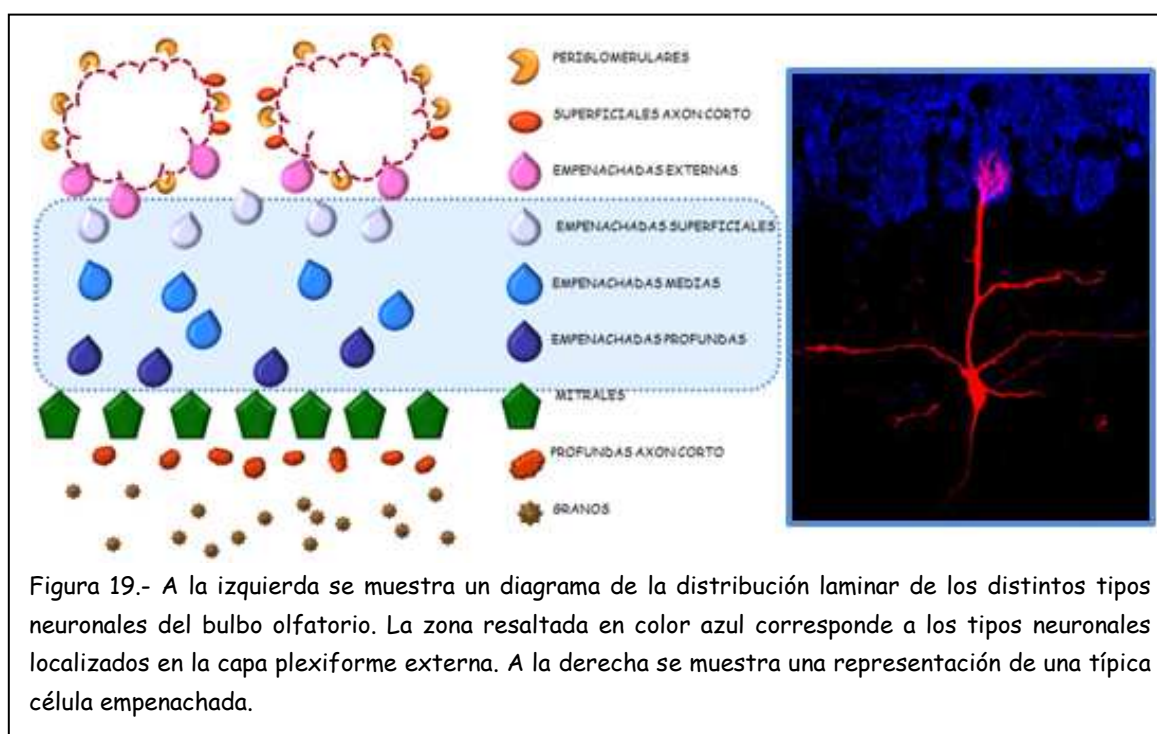
La mayoría de estas interneuronas son positivas a la proteína ligante de calcio parvalbúmina y GABAérgicas y, por tanto, inhibitorias (Mugnaini y cols, 1984a, b; Gall y cols, 1987; Kosaka y cols., 1987b; Ennis y cols., 2007).



En esta capa también se encuentran las células empenachadas, que comparten muchas características morfológicas, sinápticas y fisiológicas con las células mitrales. De hecho, las dendritas de ambos tipos son difícilmente diferenciados ultraestructuralmente (Hayar y cols., 2004b; Kosaka y Kosaka, 2005a; Griff y cols., 2008a, b). Debido a esta similitud, en la literatura se hace referencia a ellas

generalizando las dos poblaciones como M/T (Ennis y cols., 2007). Otra característica que comparten las células empenachadas de la CPE con las células mitrales es que son neuronas de proyección, a diferencia de las cEEs de la CG, que son interneuronas locales (Ennis y cols., 2007).

Las neuronas empenachadas de la CPE se han clasificado en 3 subtipos atendiendo a su distribución en la capa: células empenachadas superficiales (cESs), empenachadas medias (cEMs) y empenachadas profundas (cEPs). Aunque la morfología de sus somas es similar, el tamaño aumenta gradualmente a medida que aparecen más profundas en la capa. Estas neuronas presentan característicamente una dendrita apical que se adentra y ramifica en un glomérulo y una o varias dendritas laterales que se extienden tangencialmente por la CPE (Pinching and Powell, 1971a; Ennis y cols., 2007).



La población de células empenachadas es mucho más heterogénea de lo que se describió en un primer momento (Pinching y Powell, 1971a, b, c). Esta heterogeneidad ha sido motivo de numerosas discrepancias en la literatura. En un principio las cESs y las cEEs fueron consideradas conjuntamente, dada su localización en regiones

próximas. Más tarde, basándose en la heterogeneidad de los penachos dendríticos y de las proyecciones axónicas se propuso una nueva clasificación que diferencia estas dos poblaciones: las neuronas empenachadas de la zona glomerular que actúan como interneuronas y las neuronas empenachadas de proyección situadas en la zona más superficial de la CPE y, que al igual que el resto de empenachadas de la CPE, comparten más semejanzas con las células mitrales que con las células yuxtglomerulares (Macrides y Schneider, 1982; Schoenfeld y Macrides, 1985). En nuestro estudio hemos decidido aplicar la clasificación, en la que se denomina cEEs a las localizadas en la capa glomerular, mientras que con el término cM/Es nos referimos a las situadas en la capa plexiforme y que son similares a las mitrales.

**CAPA DE LAS CÉLULAS MITRALES (CCM).** Por debajo de la CPE se localiza una fina capa que contiene principalmente los somas de células mitrales (fig. 20) (Frazier y Brunjes, 1988). Las células mitrales, cuyo soma puede llegar a alcanzar un tamaño medio de 25-35  $\mu\text{m}$  de diámetro son, junto con las empenachadas (cM/Es) las principales neuronas de proyección del bulbo, y al igual que las empenachadas de la CPE son neuronas glutamatérgicas, de carácter excitatorio (Isaacson y Strowbridge 1998; Schoppa y cols 1998; Aroniadou-Anderjaska y cols., 1999a, b; Ennis y cols., 2007).

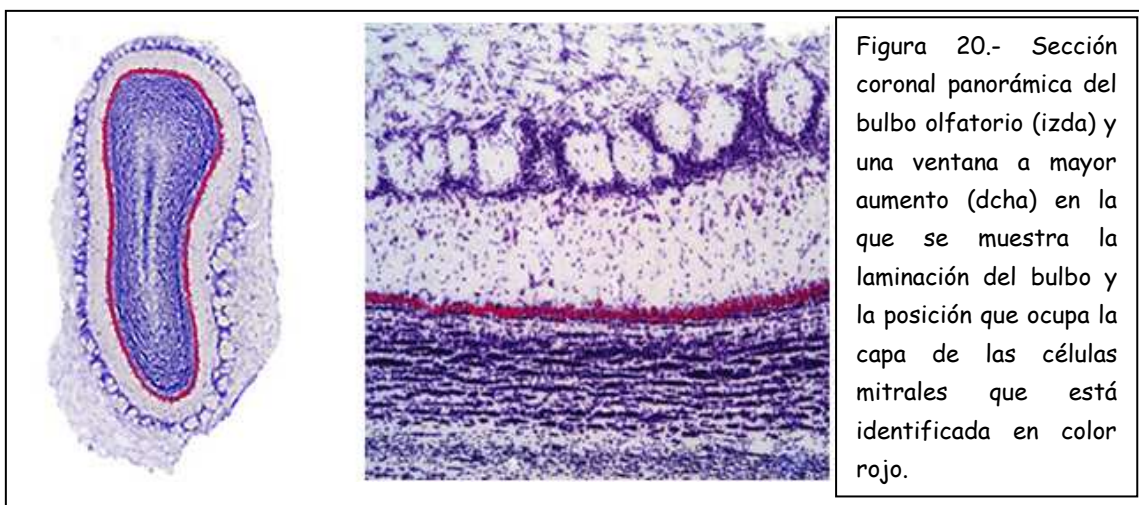
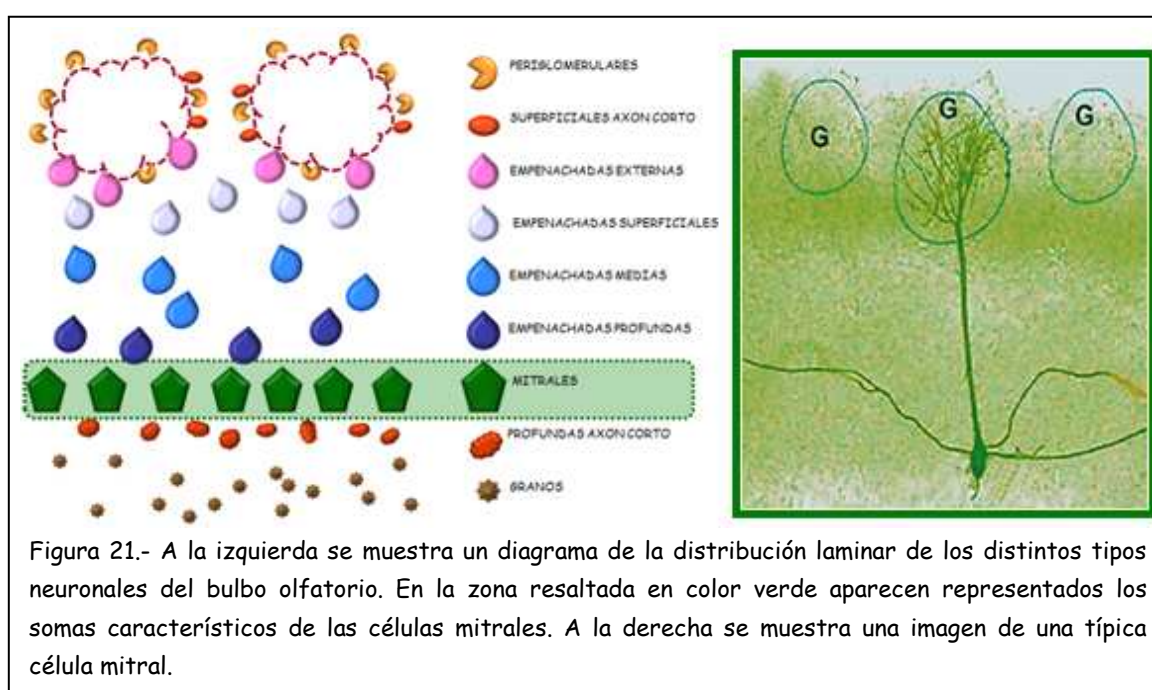


Figura 20.- Sección coronal panorámica del bulbo olfatorio (izda) y una ventana a mayor aumento (dcha) en la que se muestra la laminación del bulbo y la posición que ocupa la capa de las células mitrales que está identificada en color rojo.

Éstas presentan una dendrita apical que atraviesa toda la CPE para alcanzar un sólo glomérulo, dentro del que se arboriza extensamente, y varias dendritas basales, también llamadas secundarias o laterales, que se extienden ampliamente en sentido tangencial por la CPE (fig. 21) (Cajal, 1911a, Ennis y cols., 2007). Según la distribución de sus dendritas laterales, las células mitrales han sido clasificadas en dos subtipos. Las mitrales tipo I extienden sus dendritas secundarias por la zona más profunda de la CPE, mientras que las dendritas de las de tipo II se distribuyen preferentemente por la zona intermedia de esta capa (Orona y cols, 1984).



**CAPA PLEXIFORME INTERNA (CPI).** Es una capa relativamente fina, de densidad celular más bien baja (fig. 22). Las pocas neuronas que ocupan esta capa son algunas células profundas de axón corto (cPACs), principalmente las de tipo horizontal (fig. 23). Sin embargo, son realmente las dendritas de las propias células horizontales, las ramificaciones dendríticas de células grano, y los axones de células mitrales y empenachadas, los que dan identidad a esta capa (Price y Powell, 1970a; Kratskin y Belluzzi, 2003, Ennis y cols., 2007).

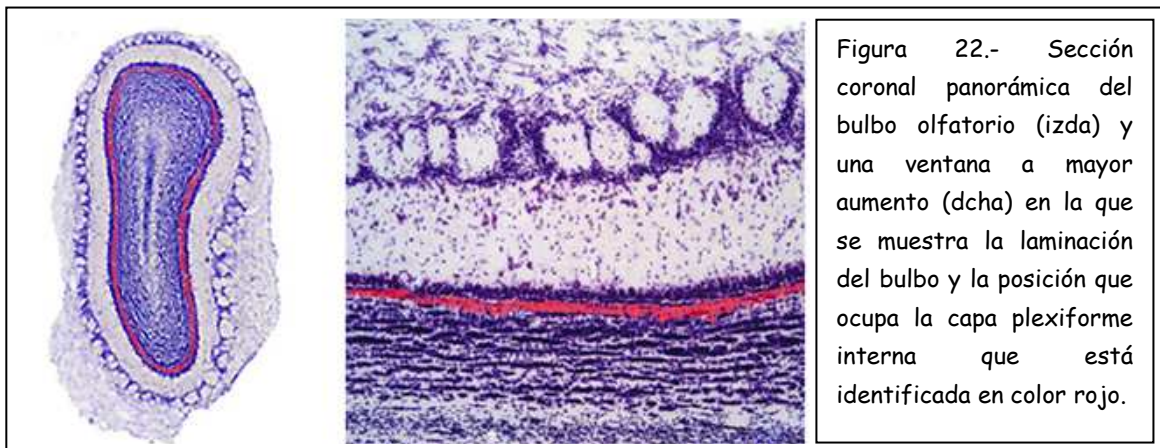


Figura 22.- Sección coronal panorámica del bulbo olfatorio (izda) y una ventana a mayor aumento (dcha) en la que se muestra la laminación del bulbo y la posición que ocupa la capa plexiforme interna que está identificada en color rojo.

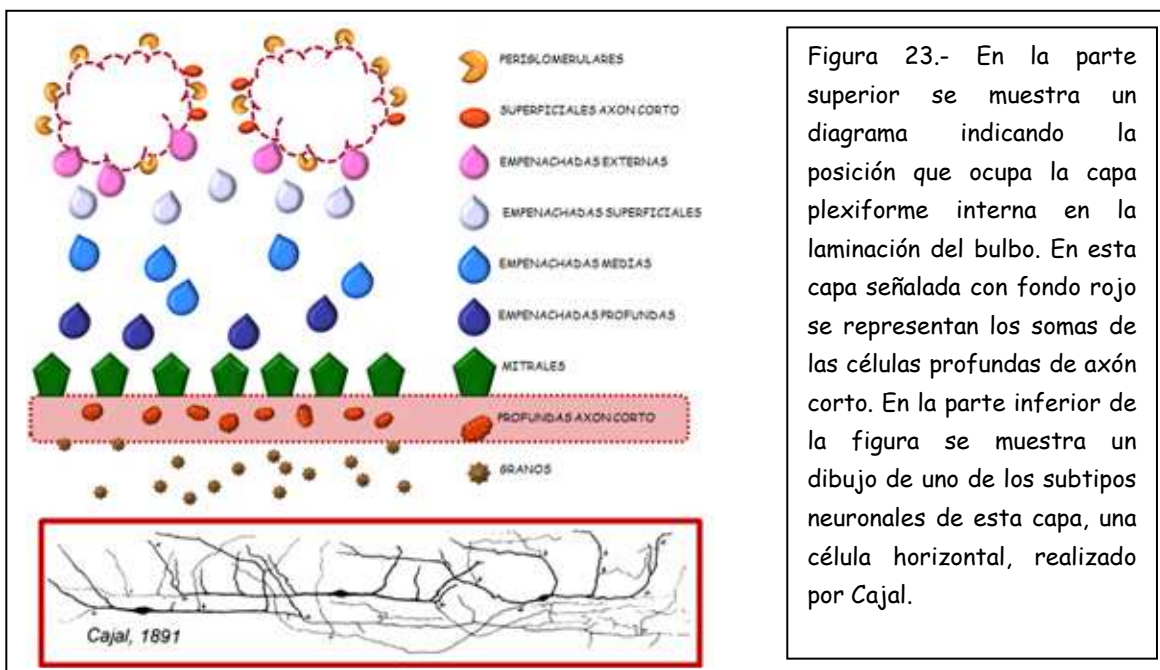
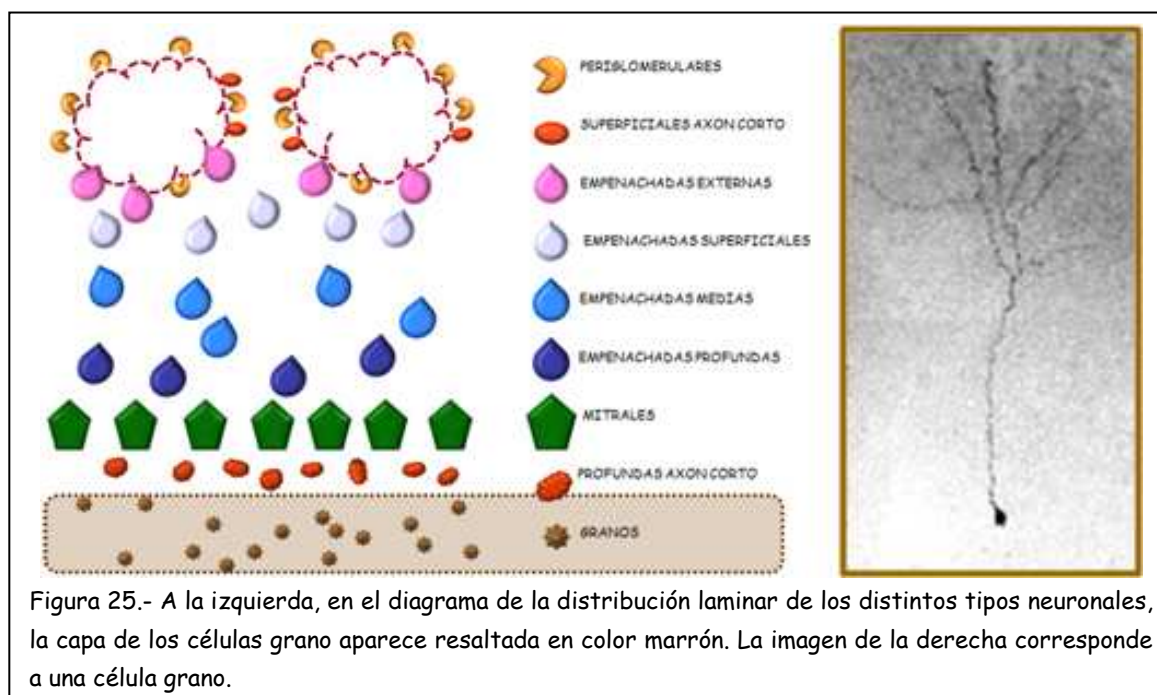
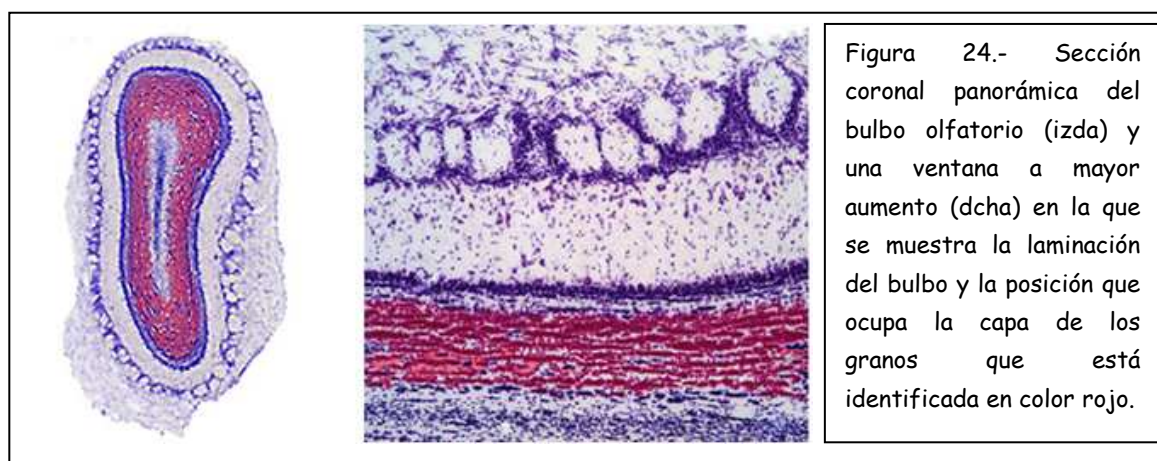


Figura 23.- En la parte superior se muestra un diagrama indicando la posición que ocupa la capa plexiforme interna en la laminación del bulbo. En esta capa señalada con fondo rojo se representan los somas de las células profundas de axón corto. En la parte inferior de la figura se muestra un dibujo de uno de los subtipos neuronales de esta capa, una célula horizontal, realizado por Cajal.

**CAPA DE LAS CÉLULAS GRANO (CCG).** Es la capa más profunda del bulbo y, aunque no es la de mayor densidad celular, sí es la que contiene mayor número de células (fig. 24). La población neuronal predominante son las células grano (cGRs) que dan nombre a la capa (fig. 25), aunque también podemos encontrar células profundas de axón corto (cPACs) como células de Golgi, verticales de Cajal y células de Blanes (Price y Powell, 1970b; Ennis y cols., 2007).

La característica más destacada de las cGRs es que carecen de axón (Pinching y Powell, 1971a), presentan un pequeño soma esférico (5-8  $\mu\text{m}$  de diámetro) del que surge una dendrita apical que se ramifica en la CPE en donde contacta con dendritas

de cM/Es (fig. 24). De la parte opuesta del soma surgen algunas dendritas basales cortas que quedan restringidas a las proximidades del soma (Greer, 1987; Mori, 1987; Woolf y cols., 1991). Las cGRs son interneuronas inhibitorias, y casi exclusivamente GABAérgicas (Quinn y Cagan, 1980; 1982)



## 2. ORGANIZACIÓN SINÁPTICA DEL BULBO OLFATORIO

Una vez conocidos los principales elementos del bulbo, describiremos las principales interacciones entre ellos, que son las responsables del procesamiento

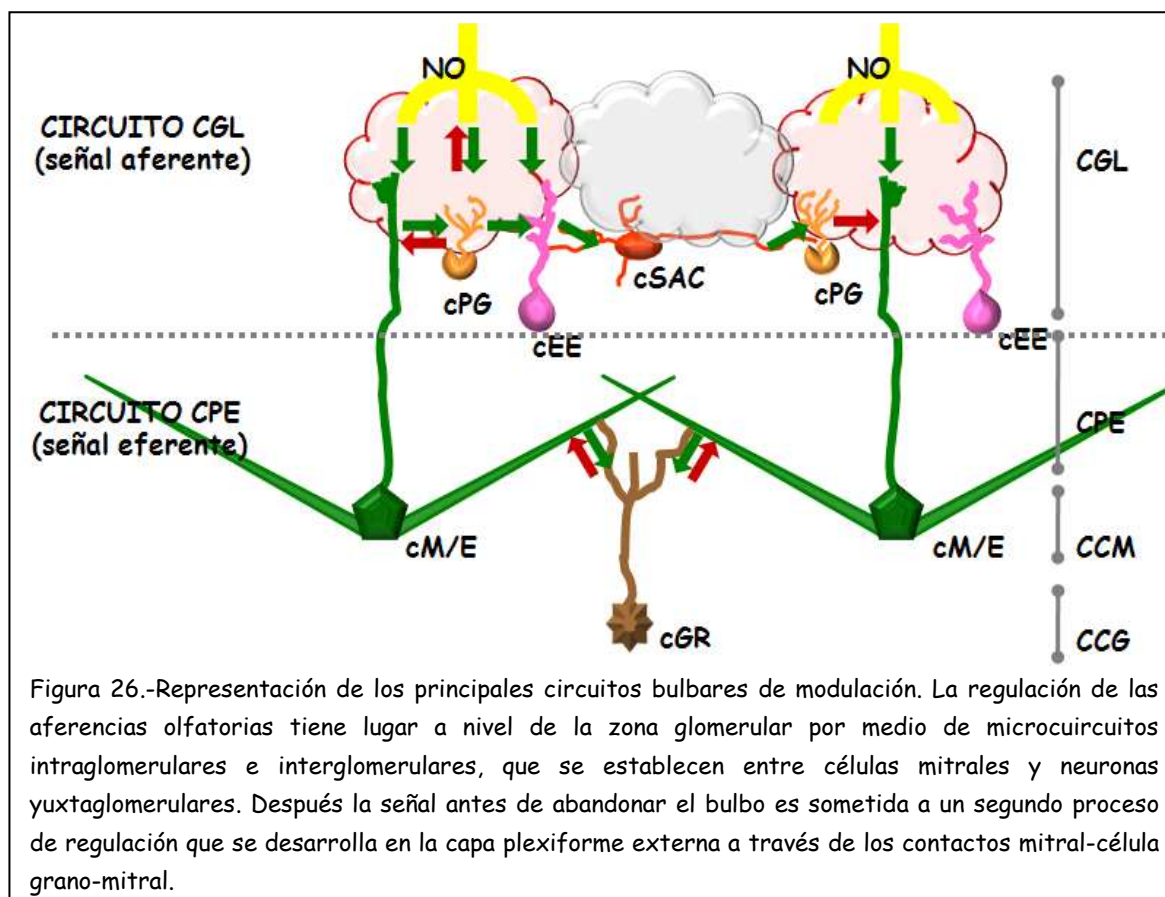
inicial de la señal olfatoria. En primer lugar comentamos brevemente como es seleccionada y clasificada topográficamente la entrada de la información olfatoria antes de llegar al bulbo. Después describimos más detalladamente la circuitería bulbar que regula y modula la información antes de que ésta sea transmitida a centros olfatorios superiores.

En líneas generales, el circuito bulbar es activado cuando un estímulo odorante provoca la liberación de glutamato desde los axones terminales de las NROs, provocando la excitación directa de las cM/Es, a través de sus dendritas apicales. Las cM/Es toman la información de relevo, y llevan la señal de salida directamente a dianas situadas en regiones corticales olfatorias (Aroniadou-Anderjaska y cols., 1997; Murphy y cols., 2004; Wachowiak y Shipley, 2006; Ennis y cols., 2007). Estas cM/Es se encargan de integrar la información captada, pero a diferencia de las neuronas de proyección de otros sistemas sensoriales, hasta la fecha no hay evidencias ultraestructurales de contactos sinápticos directos entre cM/Es (Pinching y Powell, 1971b, c; Toida y cols., 1996; Kosaka y cols., 1997), aunque existen algunas evidencias de que las cM/Es asociadas a un mismo glomérulo están acopladas eléctricamente por *gap junctions* (Schoppa y Westbrook, 2002; De Saint Jan y cols., 2009). Estas cM/Es interaccionan entre sí a través de las conexiones que establecen con diferentes tipos de interneuronas. Estos circuitos son los que permiten que la información sea regulada y modulada antes de que las cM/Es den salida a la información (Shipley y cols., 1995; Kratskin y Belluzzi, 2003).

Los procesos de regulación tienen lugar básicamente a dos niveles, glomerular e infraglomerular (fig. 26). La **modulación a nivel glomerular** es la que se ejerce sobre la aferencia olfatoria, es decir, sobre la entrada de información, y tiene lugar por el circuito formado por axones olfatorios, neuronas principales y neuronas yuxtaglomerulares. La **modulación a nivel infraglomerular** es la que se ejerce sobre la eferencia olfatoria, o salida de la información, y es ejecutada por las interacciones establecidas entre las neuronas principales y las células grano. En ambos circuitos de regulación hay un alto porcentaje de interacciones de tipo dendrodendrítico, a nivel glomerular sobre las dendritas apicales de las células principales y a nivel



infraglomerular sobre sus dendritas basales (Smith y Jahr, 2002; Schoppa y Urban, 2003; Vucinic y cols., 2006). Estas sinapsis dendrodendríticas son especialmente abundantes y elaboradas en el bulbo olfatorio, por lo que han servido como modelo y referencia en diferentes estudios de sinaptología (Aroniadou-Anderjaska y cols., 1999b; Ennis y cols., 2007).

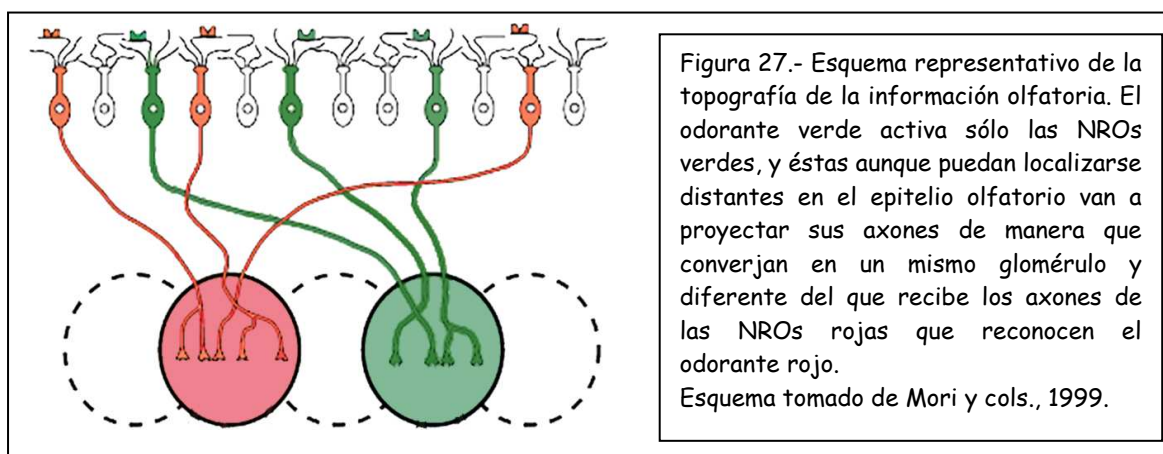


Además de éstos, existen otros mecanismos reguladores en el bulbo olfatorio, los cuales serán comentados brevemente: la retroinhibición del nervio olfatorio, la modulación centrífuga, la autoexcitación de las cM/Es y el sistema de asociación intrabulbar.

Antes de pasar a describir los circuitos sinápticos de regulación del bulbo vamos a hacer una breve reseña a dos características peculiares del bulbo olfatorio en relación con la sinaptología.

## 2.1. CIRCUITO DE ENTRADA: MAPA TOPOGRÁFICO OLFATORIO

Cuando el nervio olfatorio alcanza el bulbo ipsilateral, cada uno de los axones de las NROs invade normalmente un solo glomérulo (Ressler y cols., 1994; Vassar y cols., 1994; Mombaerts y cols., 1996; Treloar y cols., 2002), y lo hacen de manera que sólo en un mismo glomérulo convergen los axones de aquellas NROs, dispersas por toda la extensión del epitelio olfatorio, que expresan un mismo receptor, es decir, que reconocen con máxima afinidad el mismo compuesto odorante (Buck y Axel, 1991). Por lo tanto, un glomérulo individual representa el perfil odorante del receptor expresado por los cientos de NROs que lo inervan (fig. 27) (Mori y cols., 1999; Bozza y cols., 2002; Shepherd y cols., 2004; Wachowiak y Shipley, 2006). Estos estudios han servido para corroborar que cada glomérulo constituye una unidad anatómico-funcional de procesamiento de la entrada de información olfatoria (Wachowiak y Shipley, 2006).

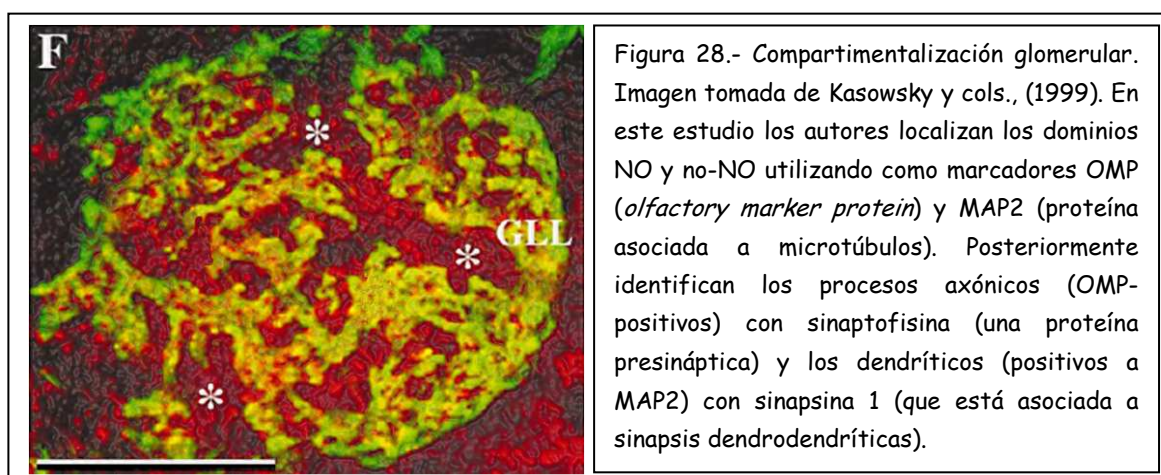


Teniendo en cuenta que las cM/Es, proyectan una sola dendrita apical a un sólo glomérulo (Shipley y cols., 1995; Krastin y Belluzzi, 2003), se puede decir que la excitación de una determinada cM/E responde con máxima intensidad sólo a un determinado compuesto odorante (Mori y cols., 1999; Lledo y cols., 2005).

## 2.2. COMPARTIMENTALIZACIÓN DE LOS GLOMÉRULOS

Aunque aparentemente los procesos axónicos y dendríticos se entremezclan en el glomérulo al azar, su distribución está espacialmente segregada, quedando unos y

otros restringidos a determinadas áreas (Hálasz y Greer, 1993). Kosaka y colaboradores (1997) identificaron estos compartimentos denominándolos como zona-NO, ocupada por terminales axónicas del nervio olfatorio, y zona no-NO a la ocupada por procesos dendríticos. Estas zonas se distribuyen a modo de isletas o parches interdigitados entre sí (fig. 28). Posteriormente se observó que esta compartimentalización es reflejo de la segregación o distribución de sinapsis en el glomérulo, de tal manera que las interacciones axodendríticas que establecen las NROs sobre sus dianas quedan restringidas al dominio axonal, mientras que las sinapsis dendrodendríticas, que se producen principalmente entre interneuronas locales y dendritas de neuronas de proyección, tienen lugar en el dominio dendrítico (Kosaka y cols., 1998; Kasowski y cols., 1999).



### 2.3. REGULACIÓN RETROINHIBITORIA DEL NERVIOL OLFATORIO

La entrada de información olfatoria se produce por contacto sináptico desde el nervio olfatorio no sólo sobre cM/Es sino también sobre neuronas yuxtglomerulares, y algunas de éstas últimas, concretamente las cPGs regulan esta entrada del nervio olfatorio.

Las cPGs contienen mayoritariamente neurotransmisores de carácter inhibitorio como dopamina y/o GABA (Halász y Shepherd, 1983; Gall y cols., 1987; McLean y Shipley, 1988; Kosaka y cols., 1985, 1987a, b, c., 1988; Ennis y cols., 2007),

que actúan a través de receptores presinápticos  $GABA_B$  y D2, respectivamente, localizados en los terminales axónicos del nervio olfatorio (Mansour y cols., 1990; Coronas y cols., 1997; Aroniadou-Anderjaska y cols., 2000; Berkowicz y Trombley, 2000; Smith y Jahr, 2002; Murphy y cols, 2005; Vucinic y cols., 2006). Ante la entrada de un estímulo excitatorio, las cPGs liberan ambos neurotransmisores produciendo una inhibición presináptica sobre el nervio olfatorio, impidiendo (o reduciendo) la liberación de glutamato desde el mismo (Nickell y cols. 1991; Coronas y cols. 1997; Koster y cols. 1999; Berkowicz y Trombley, 2000; Maher y Westbrook, 2008).

## **2.4. MODULACIÓN DE LA SEÑAL AFERENTE OLFATORIA: EL CIRCUITO GLOMERULAR**

De forma muy escueta se puede decir que cada glomérulo incorpora un circuito modulador que consiste básicamente en unos elementos de entrada, los axones de las NROs, unas neuronas de proyección, las cM/Es, y unas interneuronas locales, las neuronas yuxtglomerulares, que interactúan a través de una intrincada red dendrodendrítica, entre ellas y con el resto de elementos (Pinching and Powell, 1971b, c; Kosaka y cols, 2005a; Chen y Shepherd, 2005; Ma y Lowe, 2010). Este circuito glomerular regula la transmisión de la señal principalmente sobre las dendritas apicales de las cM/Es, junto con la modulación retroinhibitoria de los axones del NO, que, a diferencia de la anterior, no se produce a través de contactos sinápticos (Aroniadou-Anderjaska y cols., 2000; Ennis y cols 2001; Hsia y cols 1999; Berkowicz y Trombley, 2000; Smith y Jahr, 2002; Murphy y cols, 2005; Vucinic y cols., 2006).

El árbol dendrítico de las neuronas yuxtglomerulares, así como las dendritas apicales de las cM/Es invaden un solo glomérulo, excepto las cSACs que pueden presentar 2-3 dendritas que alcanzan glomérulos adyacentes (Hayar y cols, 2004b). En un mismo glomérulo confluyen varias cM/Es y numerosas neuronas yuxtglomerulares (Pinching and Powell, 1971a, b; Ennis y cols., 2007; Kiyokage y cols, 2010). El nervio olfatorio hace contacto directo principalmente sobre las cM/Es

mediante sinapsis excitatorias glutamatérgicas, pero también sobre cEEs y algunas cPGs (Liu y cols., 1989; Christie y cols., 2001; Hayar y cols., 2004b), mientras que el resto de cPGs junto con las cSACs, reciben la señal de forma indirecta por contactos dendrodendríticos desde las anteriores (fig. 29) (Pinching y Powell, 1971a; Hayar y cols., 2004b; Wachowiak y Shipley, 2006; Liu y Shipley, 2008). En general las neuronas yuxtaglomerulares, excepto las cEEs, utilizan como neurotransmisor GABA y por tanto son inhibitorias (Mugnaini y cols., 1984a; Halász y cols., 1983., 1985; Halász y Shepherd, 1983; Gall y cols., 1987; McLean y Shipley, 1988; Kosaka y cols., 1985, 1987a, b, c., 1988; Ennis y cols., 2007).

Como vemos, en relación a la entrada del nervio olfatorio, las cPGs muestran parte de su heterogeneidad. De hecho han sido diferenciadas dos subpoblaciones, las cPGs tipo I que reciben entrada directa del nervio olfatorio y las cPGs tipo II que no establecen sinapsis directa con el nervio olfatorio (Toida y cols., 1998, 2000; Kosaka y Kosaka, 2005a, b).

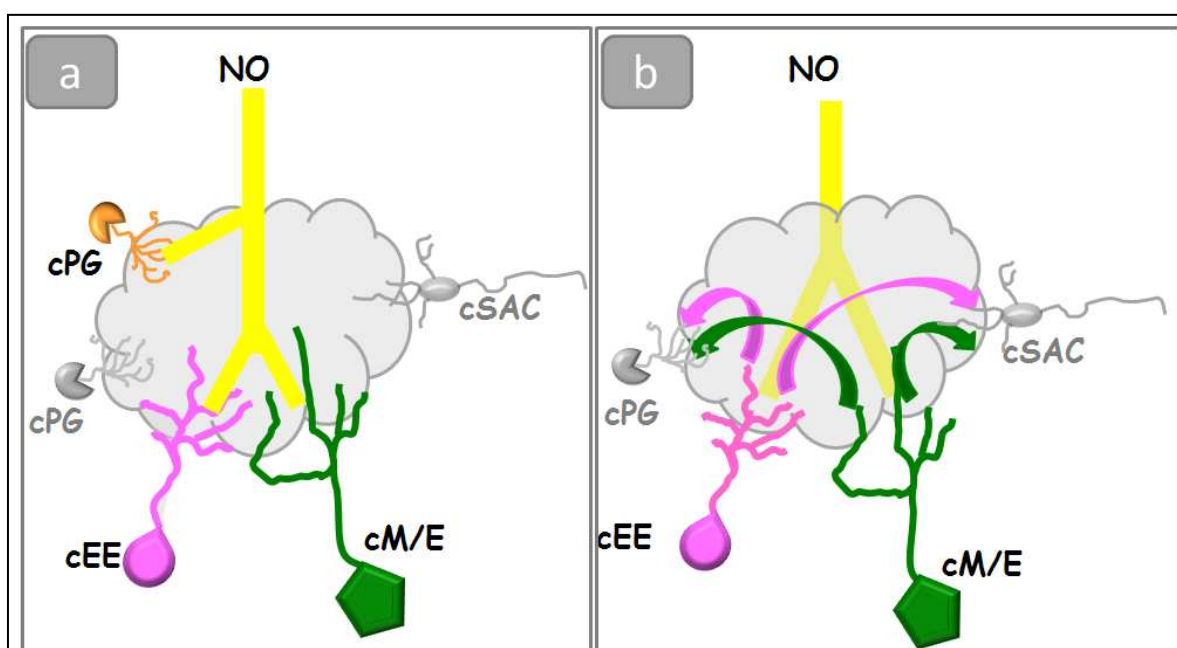
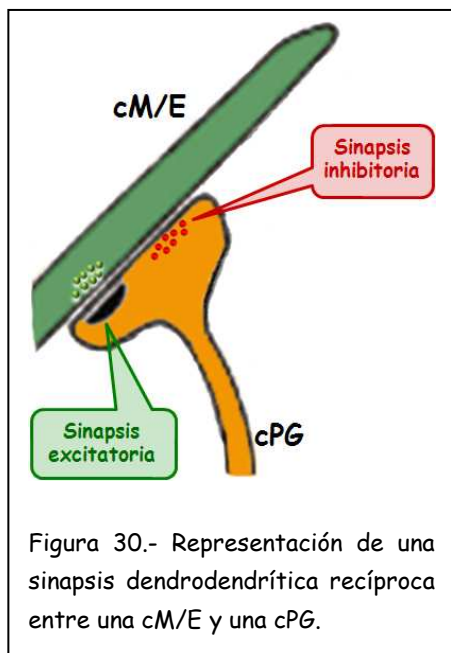


Figura 29.- El esquema (a) representa la entrada directa del NO sobre una parte de la población de células yuxtaglomerulares, las cEEs y las cPGs de tipo I, además de toda la población de neuronas principales, cM/Es. En el esquema (b) las neuronas que reciben esta entrada directa establecen contacto sobre las que no la reciben y así les proporcionan la información de entrada.

La compleja red de sinapsis excitatoria e inhibitorias que se establecen en el glomérulo es responsable de la **modulación intraglomerular** de la señal olfatoria a nivel de las dendritas apicales de las cM/Es. En esta regulación juegan un papel muy importante las sinapsis dendrodendríticas, y más concretamente las llamadas **sinapsis recíprocas** (fig. 30). Éstas son sinapsis dendrodendríticas excitatorias que establecen las cM/Es sobre las cPGs del mismo glomérulo y que están apareadas con



sinapsis dendrodendríticas inhibitorias de retorno, que actúan en sentido inverso desde las cPGs hacia las cM/Es (Sheperd y Greer, 1990; Kosaka y cols., 1998; Toida y cols., 1998, 2000; McQuiston y Katz, 2001). De esta forma las neuronas principales pueden autorregularse, ya que al activar a las cPGs, promueven su propia inhibición (Shiple y Ennis, 1996; Mori y cols., 1998).

La aparición de las sinapsis recíprocas está segregada en las cPGs, y esta segregación es complementaria a la de la entrada del nervio olfatorio. Las cPGs tipo I, que reciben entrada

directa del nervio olfatorio, apenas establecen sinapsis recíprocas, mientras que las cPGs tipo II, que no reciben sinapsis directa del nervio olfatorio, son las que mayoritariamente establecen sinapsis recíprocas con las cM/Es (Toida y cols., 1998, 2000,; Kosaka y Kosaka, 2005a, b).

Los glomérulos son unidades funcionales por sí mismas y como hemos visto se modulan internamente, pero esto no implica que actúen de forma individualizada. Es más, entre los diferentes glomérulos se establece una extensa red de conexiones que es responsable de la **modulación interglomerular** de la señal olfatoria. A diferencia del anterior, en el circuito interglomerular sólo participan interneuronas y se establece por proyecciones axónicas. Los axones de neuronas yuxtglomerulares nunca abandonan la zona glomerular, pero pueden proyectar localmente en la propia capa, alcanzando glomérulos vecinos (Pinching y Powell, 1972a, b; Shipley y Ennis,

1996; Hayar y cols, 2004a; Ennis y cols., 2007; Kiyokage y cols., 2010). El recorrido de estos axones es variable en función del tipo neuronal, y normalmente proyectan una distancia media de 4-12 glomérulos (Pinching y Powell, 1971a, b), excepto las cSACs que pueden llegar a recorrer distancias equivalentes de hasta 100 glomérulos (Aungst y cols., 2003; Shao y cols., 2009, Kiyokage y cols., 2010). Las principales dianas de estos axones en el glomérulo de destino son, tanto dendritas de otras neuronas yuxtglomerulares, como dendritas apicales de las neuronas de cM/Es

Una muestra más de la heterogeneidad de las cPGs es que, de forma similar a lo que ocurre en el circuito de entrada del nervio olfatorio al glomérulo, no toda la población de cPGs participa en esta red ya que no todas las cPGs poseen axón, pudiéndose diferenciar dos subpoblaciones de cPGs: axónicas y anaxónicas (Pinching y Powell, 1971a, 1972c).

Recientemente se ha demostrado que el principal elemento de este circuito son las cSACs, conocidas también como "yuxtglomerulares de largo alcance" (Aungst y cols., 2003). Aunque las cSACs fueron clásicamente consideradas como inhibitorias, algunos estudios concluyen que el circuito interglomerular formado por las cSACs actúa a través de conexiones excitatorias glutamatérgicas (Aungst y cols., 2003; Wachowiak y Shipley, 2006). Las cSACs, una vez activadas por las células empenachadas que reciben contacto directo del nervio olfatorio, hacen sinapsis sobre cPGs de otros glomérulos y éstas, a través del circuito intraglomerular, ejercen su inhibición sobre las cM/Es de su mismo glomérulo. De esta manera se impide la transmisión de la señal en los glomérulos vecinos, y por tanto se incrementa el contraste de actividad entre glomérulos que procesan información olfatoria diferente (Aungst y cols., 2003; Wachowiak y Shipley, 2006).

## **2.5. REGULACIÓN CENTRÍFUGA DEL CIRCUITO GLOMERULAR**

El SNC controla y ajusta la fisiología bulbar mediante proyecciones centrífugas. El bulbo olfatorio, a diferencia de otros centros sensoriales primarios, recibe una densa inervación centrífuga (Davis y cols., 1978; Davis y Macrides, 1981; Shipley y Ennis, 1996). Esta inervación procede, tanto de centros relacionados con la

vía olfatoria, como de estructuras subcorticales no-olfatorias, y son de diferente naturaleza. Los más importantes tienen naturaleza colinérgica, GABAérgica, serotoninérgica y noradrenérgica (Zaborszky y cols., 1986; Onteniente y cols., 1986; McLean y Shipley, 1987; McLean y cols., 1989). Estos sistemas de inervación centrífuga alcanzan todas las capas bulbares, aunque la inervación es especialmente densa en la CGL, donde modulan tanto los circuitos intraglomerulares como los interglomerulares. En este sentido, una de las características más importantes de estos terminales axónicos centrífugos es que inervan fundamentalmente el dominio dendrítico, mientras que están prácticamente ausentes del compartimento axonal (Chao y cols., 1997; Kasa y cols., 1995; Wachowiak y Shipley, 2006, Gracia-Llanes y cols., 2010).

## **2.6. MODULACIÓN DE LA SEÑAL EFERENTE OLFATORIA: EL CIRCUITO INFRAGLOMERULAR**

La circuitería de la CPE se establece entre las dendritas laterales de cM/Es, que se extienden tangencialmente por la capa, y las dendritas apicales de las cGRs y de otras interneuronas de la capa (Kratskin y Belluzzi, 2003). Como ya hemos comentado las cM/Es son similares tanto en la morfología dendrítica a nivel ultraestructural como en la sinaptología (Ennis y cols., 2007) por lo que en este apartado, al igual que cuando hemos descrito la circuitería glomerular, también describiremos su circuitería de manera conjunta, sin hacer diferencia entre células mitrales y empenachadas. Por otro lado, y a diferencia de las interneuronas glomerulares, las cGRs son una población neuronal más homogénea que las cPGs (Griff y cols., 2008a, b).

La característica más llamativa, a diferencia de los circuitos glomerulares, es que el circuito de la CPE presenta una organización laminar en función de la distribución de las dendritas laterales de las cM/Es por las zonas superficial, media y profunda de la capa (Harrison y Scott, 1987; Orona y cols., 1984; Ennis y cols., 2007). Por su parte las ramificaciones dendríticas de las cGRs también siguen un patrón



laminar en este circuito (Orona y cols., 1983; Greer, 1987; Wolf y cols., 1991). Esta organización facilita, a su vez, la segregación de las sinapsis, de manera que las cGRs superficiales contactan fundamentalmente con los subtipos de empenachadas que se localizan en la mitad superficial, y las cGRs profundas sinaptan preferentemente con dendritas de células mitrales y empenachadas más profundas (Wolf y cols., 1991, Sassoé-Pogneto, 2011).

De nuevo los contactos mayoritarios en el circuito modulador de la CPE son sinapsis dendrodendríticas. Estas fueron las primeras sinapsis dendrodendríticas descritas en el SNC (Hirata, 1964; Rall y cols., 1966). Los datos fisiológicos muestran que las cM/Es ejercen una acción excitatoria glutamatérgica sobre las cGRs, mientras que el contacto de las cGRs sobre las cM/Es es GABAérgico, de carácter inhibitorio

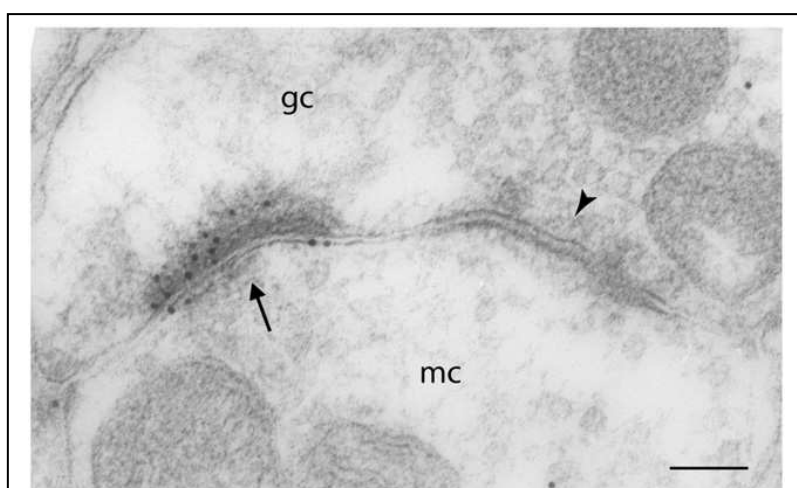


Figura 31.- Tomado de Sassoé-Pognetto, M. (2011). Fotomicrografía de microscopía electrónica que muestra una sinapsis recíproca entre la dendrita de una célula mitral (mc) y la gémula de una célula grano (gc).

(Christie y cols., 2001; Jahr y Nicoll, 1982; Schoppa y cols., 1998; Chen y cols., 2000; Ennis y cols., 2007). La microscopía electrónica ha permitido comprobar que la mayoría de estos contactos están organizados, también, como pares recíprocos (fig. 31) (Hirata, 1964;

Price y Powell, 1970b; Jackowski y cols., 1978; Woolf y cols., 1991; Shepherd, 1972, 2009; Shepherd y Greer, 1990).

Por medio de estas sinapsis dendrodendríticas apareadas las células de proyección intensamente activadas inhiben lateralmente a otras más débilmente activadas. Parece ser que este proceso facilita e incrementa la discriminación olfatoria a nivel de las eferencias (Mori y cols., 1999; Kratskin y Belluzzi, 2003).

## 2.7. AUTOEXCITACIÓN NO-SINÁPTICA DE CÉLULAS MITRALES

Aunque no se han detectado contactos entre las propias cM/Es de un mismo glomérulo (Pinching y Powell, 1971b, c, White, 1972; Toida y cols., 1996; Kosaka y cols., 1997), los registros electrofisiológicos han demostrado que éstas están funcionalmente acopladas a nivel de los penachos dendríticos apicales (Carlson y cols., 2000), de modo que se produce la autoexcitación de la propia célula (Nicoll y Jarh, 1982) o la excitación recurrente entre células adyacentes (fig. 32) (Aroniadou-Anderjaska y cols., 1999b; Schoppa y Westbrook, 2001, 2002; Urban y Sakmann, 2002).

Se ha sugerido que estos procesos de autoexcitación podrían estar mediados por un *spillover* de glutamato que actuaría sobre receptores localizados en las propias dendritas (Trombley y Westbrook, 1990; Isaacson, 1999; Bergles, 1999). Los estudios realizados por Salin y colaboradores (2001), sugieren que en este proceso estarían implicados, a nivel glomerular, los receptores AMPA localizados en las dendritas apicales, mientras que a nivel infraglomerular, en el CPE, la autoexcitación estaría mediada principalmente por receptores AMPA y NMDA localizados en las dendritas secundarias (Chen y Shepherd., 1997; Aroniadou-Anderjaska y cols., 1999a, b; Isaacson, 1999; Sassoè-Pognetto y cols., 2003).

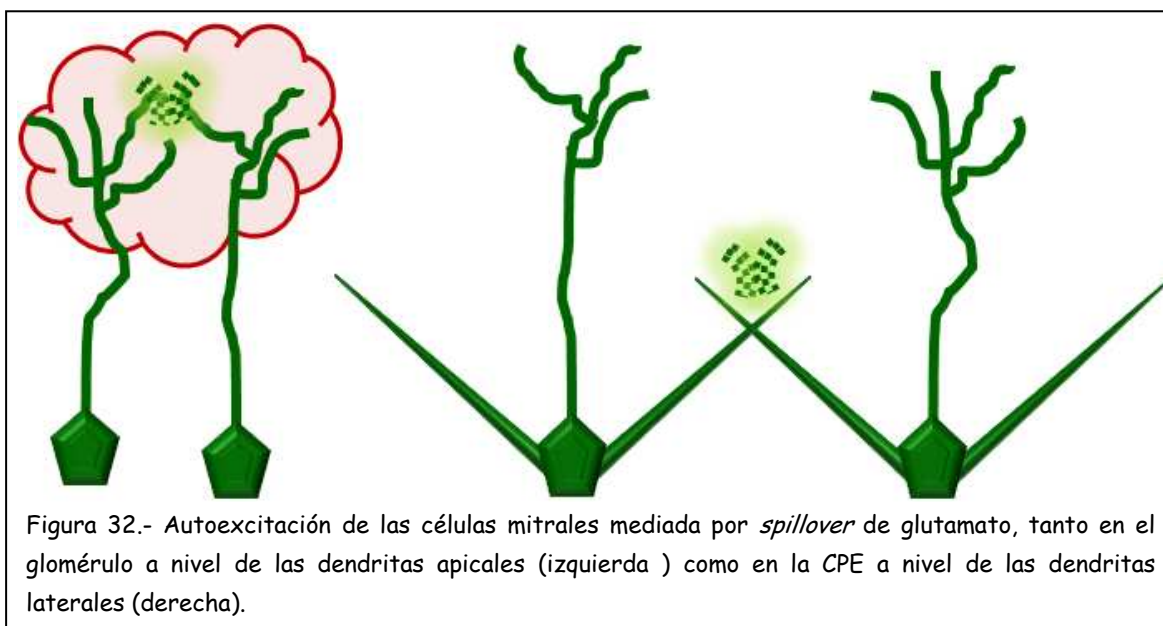
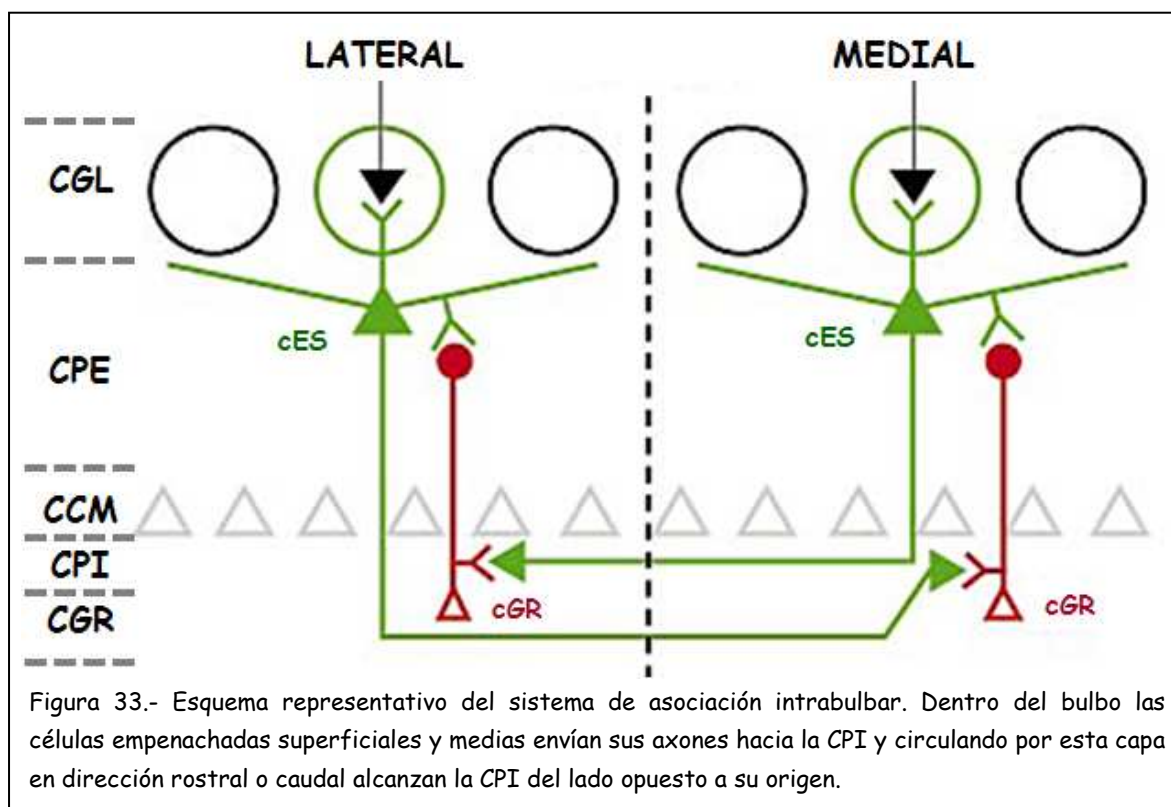


Figura 32.- Autoexcitación de las células mitrales mediada por *spillover* de glutamato, tanto en el glomérulo a nivel de las dendritas apicales (izquierda ) como en la CPE a nivel de las dendritas laterales (derecha).

No obstante, estudios posteriores demuestran que el mGluR1a juega un papel más importante que los receptores anteriormente mencionados en la autoexcitación. Como mencionamos al comienzo de la organización sináptica del bulbo, las cM/Es asociadas a un mismo glomérulo están acopladas eléctricamente por *gap junctions* (Schoppa y Westbrook, 2002; De Saint Jan y cols., 2009). Este acoplamiento eléctrico facilita que las cM/Es se exciten de forma concertada, causando un *spillover* de glutamato, capaz de saturar los transportadores de glutamato, y que resulta en una lenta despolarización que puede llegar a durar varios segundos (Christie y Westbrook, 2006). Estos potenciales postsinápticos, inusualmente largos en comparación con otros sistemas sensoriales, son debidos a la activación del mGluR1a mediada por el *spillover* generado por la liberación dendrítica de glutamato por parte de las cM/Es. Estas respuestas de larga duración mediadas por el mGluR1a parecen ser críticas no sólo para amplificar y discriminar estímulos débiles de un rico *background* olfatorio (Khan y Sobel, 2004), sino también para imponer un patrón temporal de sincronización de la actividad en el bulbo olfatorio (De Saint Jan y Westbrook, 2007). También se ha sugerido que esta actividad persistente de las células mitrales mediada por el *spillover* de glutamato puede favorecer los procesos de plasticidad sináptica (Dubnau y cols., 2003; De Saint Jan y Westbrook, 2007).

## 2.8. SISTEMA DE ASOCIACIÓN INTRABULBAR

Este sistema de proyección constituye un sistema altamente organizado que conecta regiones bulbares rostromediales y rostrolaterales con regiones cuadolaterales y caudomediales respectivamente, y viceversa (Schoenfeld y Macrides, 1984; Schoenfeld y cols., 1985). Este sistema está compuesto fundamentalmente por los axones de las cESs y cEMs que liberan colecistoquinina y atravesando la CPE y la CCM se agrupan en la CPI por donde viajan caudal o rostralmente para terminar casi exclusivamente dendritas apicales de cGRs dentro de la CPI (fig. 33) (Liu y Shipley, 1994).



## 2.9. PROYECCIONES A LA CORTEZA OLFATORIA PRIMARIA

La información olfatoria se transmite desde el bulbo olfatorio hacia la corteza olfatoria primaria a través de los axones de las células de proyección, que se agrupan en la zona lateral del bulbo formando el tracto olfatorio lateral (Shipley y cols, 1995). A través de este tracto los axones viajan caudalmente inervando las diferentes regiones que conforman la corteza olfatoria primaria (Núcleo Olfatorio Anterior, Tubérculo Olfatorio, Corteza Piriforme, Corteza Entorrinal y Tenia Tecta principalmente).

A esta proyección contribuyen los axones de cM/Es, fundamentalmente los axones de las cEMs, cEPs y de todas las células mitrales (Schoenfeld y cols., 1985; Scott, 1986). No obstante, aunque parece que todas estas células participan en la inervación de todas las regiones de la corteza olfatoria, algunos autores sugieren que, mientras las células empennachadas inervan mayoritariamente regiones rostrales, las células mitrales inervan de forma más extensa las regiones caudales (Schoenfeld y Macrides, 1984; Schoenfeld y cols., 1985; Ennis y cols., 2007).

### 3. GLUTAMATO EN EL BULBO OLFATORIO

Como hemos venido describiendo, la integración sensorial en el bulbo olfatorio está dominada por interacciones glutamatérgicas ya que, tanto los axones procedentes de las neuronas receptoras olfatorias como las células principales, utilizan glutamato como neurotransmisor (Liu y cols., 1989; Trombley y Westbrook, 1990; Sassoé-Pognetto y cols., 1993; Berkowicz y cols., 1994; Nakanishi, 1995; Ennis y cols., 1996; Schoppa y cols., 1998; Isaacson y Strowbridge, 1998; Aroniadou-Anderjaska y cols., 1999a, b; Montague y Greer, 1999). El glutamato en el bulbo olfatorio es liberado en las sinapsis tanto axodendríticas como dendrodendríticas que se establecen respectivamente entre los terminales del nervio olfatorio y las cM/Es, y entre éstas y los diferentes tipos interneuronales (Shepherd y Greer, 1990; Nicoll y Malenka, 1999; Sassoè-Pognetto y cols., 2003). Por todo ello, el bulbo olfatorio es una estructura encefálica especialmente rica en receptores de glutamato y, así, se ha descrito la presencia, tanto de receptores ionotrópicos como mGluRs, con una distribución característica en las diferentes capas bulbares (Monaghan y Cotman, 1982; Miller y cols., 1990; Petralia y Wenthold, 1992; Hayashi y cols., 1993; Martin y cols., 1993; Wisden y Seeburg, 1993a, b; Duvoisin y cols., 1995; Van den Pol, 1995; Van den Pol y cols., 1995; Giustetto y cols., 1997; Kinzie y cols., 1997; Petralia y cols., 1997). Salvo raras excepciones, la mayor parte de los diferentes tipos de subunidades de receptores AMPA y NMDA conocidos (Petralia y Wenthold, 1992; Petralia y cols., 1994a, b, c; Giustetto y cols., 1997; Montague y Greer, 1999; Sassoè-Pognetto y Ottersen, 2000) así como diferentes tipos de mGluRs (Abe y cols., 1992; Shigemoto y cols., 1992; Ohishi y cols., 1993a, b, 1995; Duvoisin y cols., 1995; Kinzie y cols., 1995, 1997; Van den Pol, 1995; Petralia y cols., 1997; Sahara y cols., 2001) se expresan en niveles que van desde moderados hasta altos en las cM/Es, así como en la mayor parte de las interneuronas bulbares.

## 4. EL BULBO OLFATORIO COMO REGIÓN EXPERIMENTAL

El sistema olfatorio y, en particular, el bulbo olfatorio, son excelentes modelos donde explorar el papel que juega la experiencia sensorial en el desarrollo y mantenimiento de los circuitos neurales, así como para el estudio de diversas formas de plasticidad neural. Estas características se sustentan sobre la base de que esta estructura es un sistema neural con gran plasticidad intrínseca por el hecho de que: i) las neuronas receptoras olfatorias se encuentran en constante recambio durante toda la vida del animal, por lo que los nuevos axones deben llegar al bulbo olfatorio y restituir las conexiones perdidas, ii) hay una continua incorporación de nuevas neuronas al bulbo olfatorio generadas en la zona subventricular de los ventrículos laterales y que acceden al bulbo a través de la corriente migratoria rostral (si bien parte de estos nuevos neuroblastos mueren, otros muchos sobreviven y se integran en la circuitería bulbar), y iii) es un sistema inherentemente plástico a la experiencia sensorial. (Altman, 1969; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Shipley y Ennis, 1996; Doetsch y cols., 1997; Goldman y Luskin, 1998; Astic y Saucier, 2001).

Por otra parte, este sistema presenta toda una serie de ventajas que permiten, de modo fácil, realizar manipulaciones dirigidas a modificar cualitativa o cuantitativamente la estimulación sensorial aferente ya que las neuronas receptoras olfatorias son accesibles desde el medio externo. En este sentido, numerosos estudios han demostrado que la correcta organización del sistema olfatorio está muy ligada a la actividad sensorial, siendo la actividad sináptica normal y la experiencia sensorial postnatal necesarias para el normal desarrollo de su circuitería (Katz y Shatz, 1996; Best y Wilson, 2003). Los *inputs* olfatorios son necesarios para la expresión de las características neuroquímicas normales (Meisami y Mousavi, 1981; Brunjes, 1985; Brunjes y cols., 1985; Wilson y Wood, 1992; Cho y cols., 1996; Johnson y cols., 1996), para los correctos patrones de proyección axónica (Brunjes, 1994; Matsutani y Yamamoto, 2000; Wilson y cols., 2000; Leung y Wilson, 2003), así como para las adecuadas características fisiológicas de las sinapsis (Guthrie y cols., 1990;

Wilson y Sullivan, 1995; Philpot y cols., 1997a; b; Best y Wilson, 2003; Leung y Wilson, 2003) tanto durante el desarrollo postnatal temprano como en la vida adulta.

La oclusión de una de las narinas en animales recién nacidos afecta significativamente el desarrollo normal del bulbo olfatorio ipsilateral a la misma, de modo que, examinado en la etapa adulta, este bulbo olfatorio presenta una reducción del 25% respecto al bulbo contralateral (ver Brunjes, 1994 para una revisión). Los efectos globales del déficit de desarrollo normal del bulbo olfatorio ocluido se han explicado entre otras, por la subsecuente modificación de la expresión de neurotrofinas y citoquinas (Gómez-Pinilla y cols., 1989; Lim y Brunjes, 1999; McLean y cols., 2001).

La privación olfatoria también provoca alteraciones en la expresión de un elevado número de neurotransmisores, sustancias neuroactivas y receptores. En el bulbo ipsilateral a la narina ocluida, tiene lugar una reducción de la expresión de tirosina hidroxilasa, el enzima limitante de la síntesis de catecolaminas, y por tanto de dopamina, en una importante población de las interneuronas de la CGL (Baker y cols., 1983; Baker, 1990; Stone y cols., 1991; Briñón y cols., 2001). Igualmente se produce una reducción de la expresión de proteínas ligantes de calcio tales como calbindina D-28k y parvalbúmina en las interneuronas de la CGL y de la CPE (Philpot y cols., 1997b). También se han descrito alteraciones en la expresión de receptores tal como ocurre para los receptores dopaminérgicos D2 (Guthrie y cols., 1991), adrenérgicos  $\beta_1$  y  $\beta_2$  (Woo y Leon, 1995), la subunidad GluR1 del receptor AMPA de glutamato (Hamilton y Coppola, 2003), la subunidad NR2B de receptores NMDA (Kim y cols., 2006) o las isoformas 1 y 2 de GAD65 (Hamilton y cols., 2008), entre otros. Igualmente se observan alteraciones en los sistemas de inervación centrífuga que proceden de regiones subcorticales como el sistema serotoninérgico, el noradrenérgico y el colinérgico (Briñón y cols., 2001; Gómez y cols., 2006, 2007a, b).

Todos estos cambios neuroquímicos parecen ser secundarios a la reducción de la actividad fisiológica normal, una reducción de la estimulación que implica modificaciones en los contactos sinápticos y en la eficacia sináptica mediada por los receptores. En este sentido hay notables evidencias que implican a los receptores de

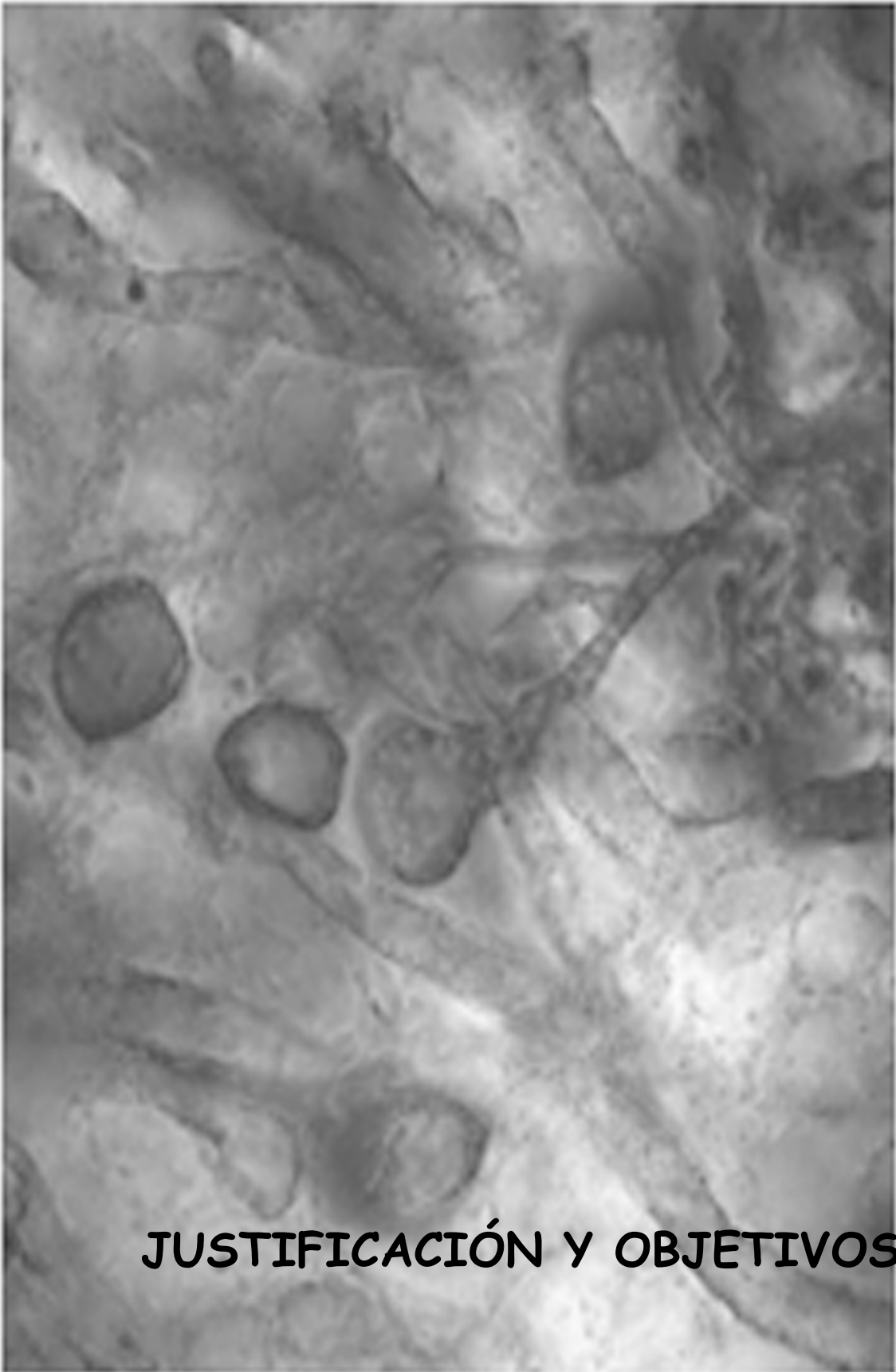
glutamato en todos estos acontecimientos. Así la reducción de la expresión de tirosina hidroxilasa parece derivada de una reducción, en el componente excitatorio mediado por receptores NMDA, de la entrada sináptica desde los terminales sensoriales (Keller y cols., 1998; Philpot y cols., 1998; Puche y Shipley, 1999). Como resultado de esta pérdida, la densidad del receptor D2 de dopamina experimenta un incremento en su expresión del 32% tanto en los axones del nervio olfatorio como en la CGL (Guthrie y cols., 1991) En las capas más profundas, el número de sinapsis entre cM/Es y las dendritas de las cGR parece reducirse (Benson y cols., 1984), aunque la inhibición de las cM/Es sufre un incremento, probablemente debido al aumento de la excitación de éstas sobre las cGR por una elevación de los niveles de excitación mediada por receptores NMDA (Wilson y cols., 1990; Wilson, 1995).

Aunque los receptores ionotrópicos de glutamato parecen tener un papel importante en los procesos de plasticidad neural, los mGluRs juegan un papel decisivo en la maduración y plasticidad del SNC (Defagot y cols., 2002). En el hipocampo y en el cerebelo, en particular, las alteraciones de la expresión de mGluRs ha sido también fuertemente ligada a cambios en la eficacia sináptica relacionados con nuevas experiencias (Bortolotto y cols., 1999a, b; Lüscher y cols., 2000; Carroll y cols., 2001). Uno de los mGluRs con más extensa expresión en el bulbo olfatorio es el mGluR1a, el cual puede estar implicado, como ocurre en otras regiones, en la modificación de la excitabilidad neuronal (Mills y cols., 2001) así como en el mantenimiento, estabilización y plasticidad de los circuitos sinápticos (Defagot y cols., 2002).

Dadas las inusuales propiedades del bulbo olfatorio en lo que respecta a plasticidad y adaptabilidad, y la posible implicación del mGluR1a en la regulación de todos estos procesos, el objeto de este estudio es analizar los posibles cambios en la expresión y/o distribución de este receptor en ratas control y un grupo experimental sujeto a deprivación olfatoria unilateral en el día de su nacimiento y mantenidas así hasta que alcanzan la edad adulta. Los resultados aquí obtenidos supondrán un aporte de nuevos datos que permitan dar nuevos pasos para entender los mecanismos que



subyacen en los fenómenos de plasticidad neural observada en el bulbo olfatorio, y la participación de los mGluRs en el inicio de estos procesos.



**JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

La visión que se suele tener acerca de los fenómenos de plasticidad neural está, con relativa frecuencia, restringida a los fenómenos de potenciación y depresión a largo plazo que son interpretados como la base neuroquímico-fisiológica sobre la que se asienta el desarrollo de capacidades tales como la memoria y el aprendizaje. Si bien estos fenómenos son de especial importancia en la concepción del SNC como una estructura dinámica y dúctil, no es menos cierto que los fenómenos de plasticidad neural también incluyen otra serie de mecanismos a través de los cuales el SNC es capaz de responder a condiciones cambiantes del entorno, mostrando su alta capacidad de adaptación.

En cualquier caso, en gran parte de estos fenómenos un factor decisivo lo representan los receptores de glutamato, tanto los ionotrópicos, especialmente los NMDA, como los metabotrópicos, ya que entre otros efectos, provocan incrementos notables de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular que dispara diversas rutas de señalización que determinarán cambios tales como la modificación de la eficacia sináptica, la regulación de la expresión de diferentes moléculas como neurotransmisores, receptores, factores neurotróficos,...o incluso modificaciones en la conectividad neuronal.

Clásicamente el eje central de los estudios de neuroplasticidad lo constituían los receptores NMDA, si bien es cierto que en los últimos años se ha dado una relevancia equiparable a los mGluRs. Dentro de éstos, nuestro estudio se ha centrado en el mGluR1a porque presenta una serie de características que le elevan como candidato a jugar un papel de cierto protagonismo en la inducción de estos fenómenos. Entre otros podemos destacar: i) su ubicación post-sináptica con una localización muy específica en relación al aparato sináptico, ii) su distintivo y particular extremo carboxi-terminal largo que le confiere la capacidad de interactuar con muy diversas moléculas, tanto estructurales como efectoras, del elemento postsináptico, iii) las capacidades que presenta, en gran medida debidas a las moléculas con las que interactúa, de activarse o desactivarse, e incluso modificar su distribución subcelular, y iv) su amplia y específica localización en distintas poblaciones neuronales en la región cerebral de nuestro interés, el bulbo olfatorio.

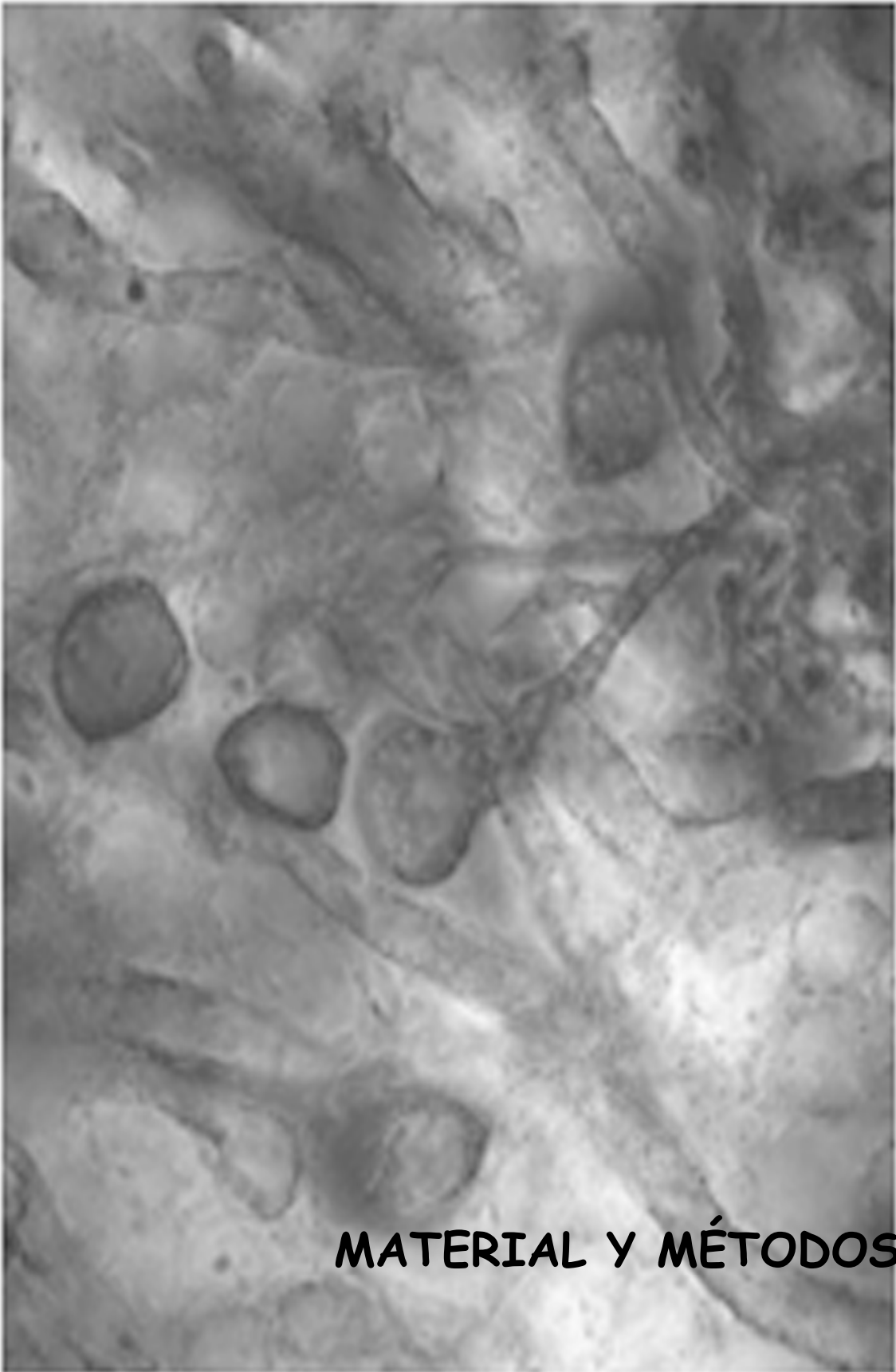
Hemos centrado nuestro estudio en el bulbo olfatorio fundamentalmente, porque, como se ha apuntado previamente, presenta unas peculiaridades que hacen de ésta una región especialmente plástica como hemos podido demostrar en los diferentes trabajos que, en este sentido, hemos desarrollado en los últimos años.

Con estos precedentes, y en el marco de la investigación que se lleva a cabo en el laboratorio en el cual se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral, los objetivos principales que nos planteamos son los siguientes:

- Dado que la descripción de los elementos que expresan el receptor mGluR1a en el bulbo olfatorio de la rata han sido, hasta el momento, realizados de forma muy general, pretendemos ofrecer un estudio detallado y exhaustivo de las poblaciones neuronales en las que este receptor está presente, intentando extraer, en función de su distribución, unas conclusiones funcionales del mismo en la circuitería bulbar.
- Siguiendo con la línea de investigación del laboratorio en el que se ha realizado la presente Tesis Doctoral, a través de la cual se han definido numerosos cambios adaptativos por parte de diferentes sistemas de neurotransmisores en el bulbo olfatorio como consecuencia de la deprivación sensorial neonatal, nos planteamos la descripción de los cambios relacionados con el sistema glutamatérgico, en concreto en lo que se refiere a la expresión del receptor mGluR1a.
- Adicionalmente, si asumimos que la inducción de neuroplasticidad viene desencadenada inicialmente por eventos relacionados con cambios en la expresión de receptores de glutamato, nos hemos propuesto relacionar los posibles cambios observados en nuestro estudio con los descritos anteriormente para otros sistemas de neurotransmisores, usando este mismo paradigma experimental. Para ello, nos proponemos realizar la caracterización de los elementos positivos a mGluR1a mediante la determinación de su

coexpresión con otros marcadores de determinadas poblaciones neuronales del bulbo olfatorio.

- Por último, considerando que la mera expresión de mGluR1a no es *per se* un parámetro indicativo de su actividad funcional, sino que ésta viene determinada, entre otras, por su localización subcelular y su grado de dimerización, nos planteamos desarrollar un estudio que nos permita determinar estos extremos, de modo que podamos inferir su grado de actividad en las diferentes condiciones experimentales analizadas.



**MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1.- MATERIAL

### 1.1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales utilizados en el trabajo experimental de esta Tesis Doctoral fueron 24 ratas macho adultas *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769), raza Wistar albina (fig. 34), de pesos comprendidos entre 250 y 280 g. obtenidos como descendencia de ejemplares gestantes suministradas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.



Figura 34.- Ratas Wistar albinas han sido utilizadas para realizar el trabajo experimental de esta Tesis Doctoral.

Dichos animales se encuadraron en dos grupos experimentales. Cada rata gestante proporcionaba una camada de 9-13 crías (fig. 34). Aproximadamente las 3/4 partes de las crías obtenidas en cada camada eran seleccionadas para constituir el grupo experimental (animales sometidos al procedimiento quirúrgico de deprivación olfatoria en el día de su nacimiento). La 1/4 parte restante de cada camada, aproximadamente 2-4 crías, eran seleccionadas para constituir el grupo de animales control (naïve), sin ser sometidas a ningún tipo de manipulación experimental.

Durante el periodo de estabulación, los animales permanecieron en jaulas estándar de 60 cm x 60 cm x 50 cm agrupadas por camadas durante el periodo de lactancia. A los 24 días aproximadamente, coincidiendo con el destete, se redistribuyeron en las jaulas, separando por un lado a las madres y por otro lado las

crías, por sexos, en grupos de no más de 3 animales por jaula. Todos los animales fueron mantenidos a temperatura constante entre 20° y 22°, con fotoperiodos de luz-oscuridad de 12-12 h y con disponibilidad de alimento, pienso compuesto (Harlan Teklad) y agua *ad libitum*. Alcanzada la edad adulta, a los 60 días (P60) en que los animales habían alcanzado un peso comprendido de 250-280 g., fueron tomados los ejemplares macho, de los grupos experimental y control, para el desarrollo del presente estudio.

Todos los procedimientos tanto de mantenimiento como experimentales a los que fueron sometidos los animales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca y cumplían la normativa establecida por la legislación española vigente (BOE 252/34367-91, 2005) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, y la normativa al respecto de la Unión Europea, la Directiva 86/609/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas y la Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo.



## 2.-MÉTODOS

### 2.1.-PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

#### 2.1.1.- DEPRIVACIÓN OLFATORIA UNILATERAL NEONATAL

En el primer día de vida postnatal (P1) se realizó el procedimiento quirúrgico para conseguir la deprivación olfatoria unilateral mediante la oclusión de una de las narinas.

La técnica quirúrgica para conseguir la oclusión de la narina consistió en la electrocauterización y posterior sutura de la narina derecha. Para ello, previamente, las crías fueron anestesiadas por hipotermia (-25°C durante 15 min). Una vez anestesiada, y manteniendo a la cría apoyada sobre la placa de contacto, se realizó la electrocauterización introduciendo el aplicador de corriente del electrocauterizador en la fosa nasal, donde se realizaron 2-3 pulsos de corriente. Sobre la zona más externa de la narina se realizaron otros 2-3 pulsos de tal manera que la piel del orificio quedara estrangulada, cerrando así la fosa nasal (fig. 35).



Posteriormente se realizaron un par de puntos de sutura sobre la zona cauterizada con seda trenzada del 6/0. Por último, con el fin de asegurar el cierre de la narina, en la zona lesionada se aplicó una gota de adhesivo tisular (embucrilato,

Histoacryl®, Braun). A continuación se aplicó sobre la zona crema antibiótica para evitar infecciones. Todo el proceso de oclusión o cierre de narinas se realizó bajo la lupa

### 2.1.2.- MANTENIMIENTO POSTOPERATORIO DE LOS ANIMALES

Tras el procedimiento quirúrgico, los animales fueron recuperados de la anestesia con la ayuda de una fuente de calor (lámpara de infrarrojos) antes de ser devueltos a la jaula con su madre.

Desde el día de la intervención se realizó un control visual diario de la oclusión, observando bajo lupa su evolución hasta su completa cicatrización que tenía lugar entre P12-P20 (fig. 36). Aquellos animales en los que se producía en algún momento la reapertura de la fosa nasal eran descartados del trabajo experimental.



A P24 los animales fueron destetados y trasladados a otras jaulas en grupos de 3 y siempre separados por sexos. A partir de este momento, hasta el día del sacrificio, los animales disponían de agua y alimento *ad libitum* con una dieta equilibrada a base de "pellets" (Harlan Teklad), y mantenidos con fotoperíodos de luz-oscuridad de 12h-12h horas y a una temperatura de 20-22°C.

Cuando alcanzaron los 60 días de edad, los animales fueron sacrificados y

procesados de diferente forma en función de las técnicas a realizar, bien para estudios neurohistológicos/inmunohistoquímicos, bien para su análisis proteico por Western-blot. Para el análisis neurohistológico/inmunohistoquímico, parte del material obtenido sería analizado mediante microscopía óptica, tanto de campo claro como de fluorescencia, mientras que otra parte lo sería mediante microscopía electrónica. Por ello, los procedimientos seguidos a partir de este punto del trabajo fueron diferentes dependiendo del objetivo final en cada caso. A continuación del siguiente esquema (fig. 37), en el que se representan las diferentes modalidades de trabajo realizadas, describiremos cómo fue obtenido y procesado el tejido en cada caso.

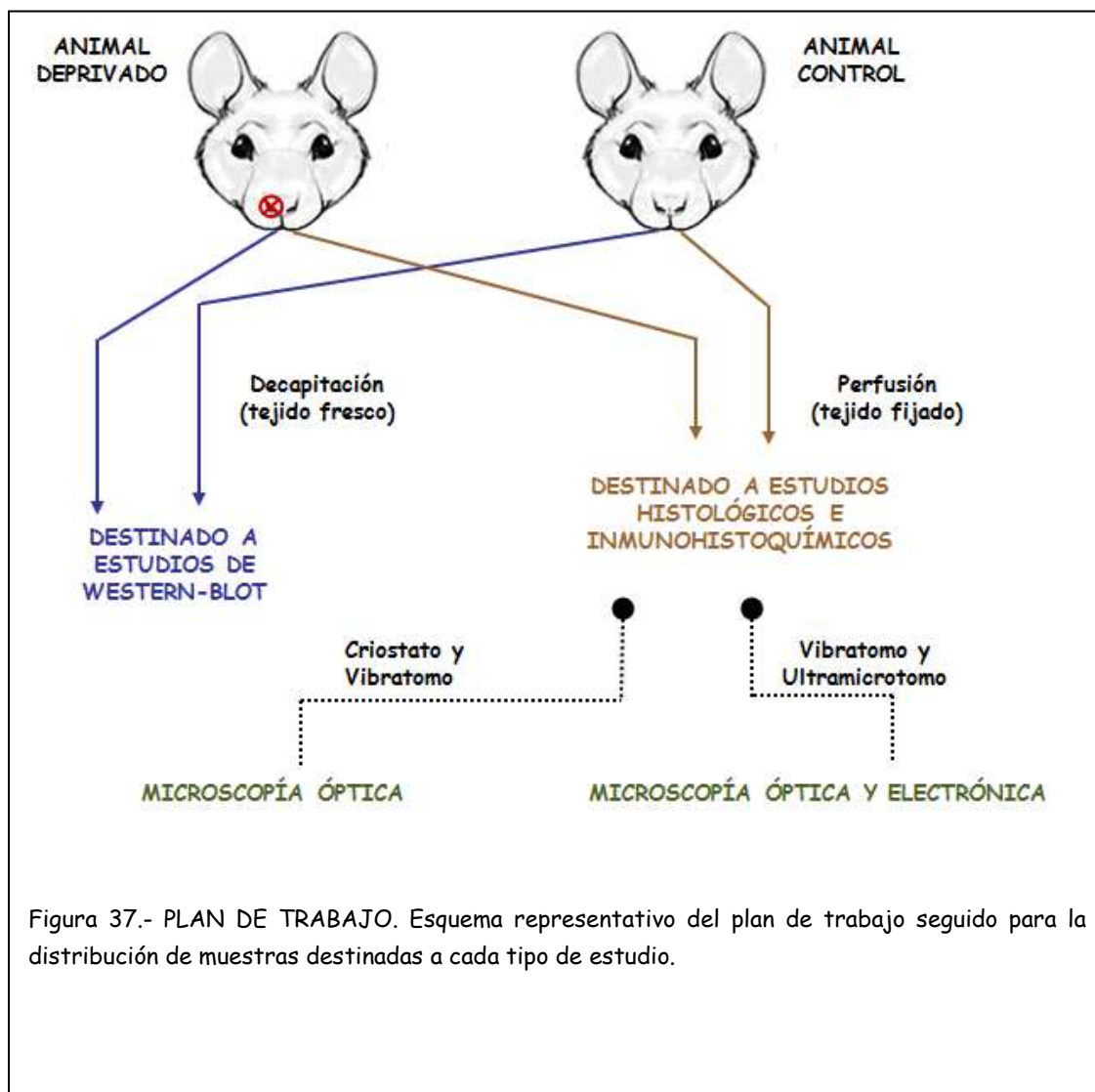


Figura 37.- PLAN DE TRABAJO. Esquema representativo del plan de trabajo seguido para la distribución de muestras destinadas a cada tipo de estudio.

## 2.2.-ESTUDIO NEUROHISTOLÓGICO

### 2.2.1.- FIJACIÓN DEL TEJIDO Y SECCIONAMIENTO

#### # PERFUSIÓN

Los animales seleccionados para realizar sobre sus secciones tinciones generales y estudios inmunohistoquímicos fueron fijados por perfusión intracardiaca. El sacrificio se realizó el día postnatal 60 (P60), cuando los animales alcanzaban un peso corporal comprendido entre 250-280 g. Para ello, previamente fueron profundamente anestesiados por medio de una inyección intramuscular, en las extremidades posteriores, de una mezcla 3:4 de relajante muscular (Clorhidrato de Tiacina, Rompún, Bayer) y anestésico (Clorhidrato de Ketamina, Ketolar, Parke Davis) en dosis de 1 ml/Kg. Los efectos anestésicos se manifestaban por la ausencia de reflejo parpebral, aproximadamente 2 min después de su aplicación.

Posteriormente los animales se colocaron sobre una rejilla a la que se sujetaron sus cuatro miembros. Se procedió a abrir el tórax y se rechazó la caja torácica hasta acceder al corazón (fig. 38). En el ventrículo izquierdo se inyectaron 0,2 ml de heparina sódica (1% en solución salina) para evitar la formación de trombos que

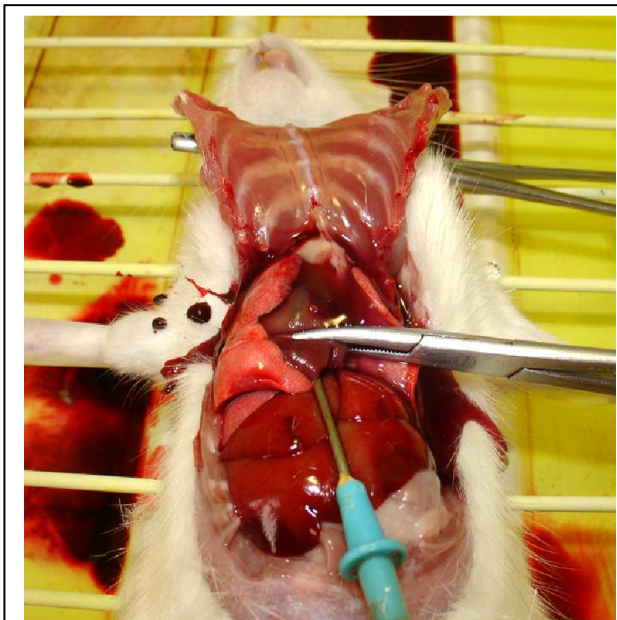


Figura 38.- PERFUSIÓN INTRACARDIACA.

dificultarían la correcta perfusión de los tejidos. Seguidamente se realizó una incisión en el ventrículo izquierdo a través de la cual se introdujo una cánula hasta alcanzar la arteria aorta ascendente y se seccionó la aurícula derecha, permitiendo así la salida de la sangre y soluciones perfundidas.

La perfusión se realizó con la ayuda de una bomba peristáltica que generaba un flujo continuo de 15 ml/min. Los animales fueron perfundidos inicialmente con 50-75

ml de solución salina (NaCl al 0,9% en agua destilada) para arrastrar toda la sangre. Esta solución de lavado estaba suplementada, además, con 50 mM de carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (un bloqueante específico del sistema ubiquitin-proteosoma) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO), y un cocktail de inhibidores de proteasas: 1 mg/ml de pepstatina, 20 mM de leupeptina, 0,3 mM aprotinina y 3,5 mM fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF). Seguidamente se perfundió una solución fijadora (250-300 ml), cuya composición variaba dependiendo de que el material fuera a ser analizado por microscopía óptica o electrónica. Para el procesado del tejido para técnicas de microscopía óptica la solución fijadora estaba compuesta por paraformaldehído despolimerizado al 4% (p/v), glutaraldehído al 0,25% (v/v) y 0,2% de ácido pícrico a saturación, en tampón fosfato 0,1 M pH 7,3 (TF). En el caso de los animales destinados a estudios ultraestructurales el fijador estaba compuesto por paraformaldehído despolimerizado al 3% y glutaraldehído al 1%, en TF.

Tras la perfusión se procedió a la extracción del encéfalo (fig. 39), y se seccionó en tres grandes bloques según el eje rostro-caudal para llevar a cabo una posterior postfijación, durante 2 h en agitación a 4 °C, en la solución de fijación anteriormente utilizada pero sin glutaraldehído. Después, el encéfalo se lavó en TF varias veces para eliminar el exceso de solución fijadora y, por último, los bloques fueron almacenados a 4 °C en TF con azida sódica al 0,05% hasta su posterior uso.

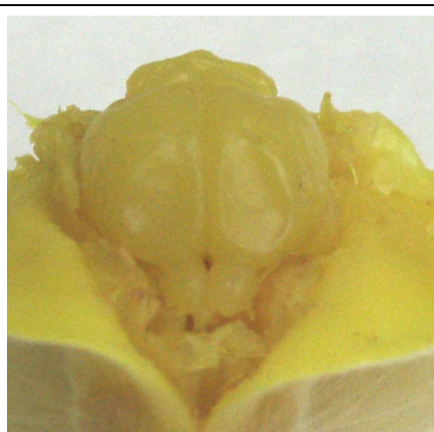


Figura 39.- EXTRACCIÓN DEL ENCÉFALO: se realiza una incisión en la piel a nivel de la línea media de la cabeza, en sentido caudo-rostral hasta alcanzar la nariz. Se tracciona la piel lateralmente, y los músculos y otros tejidos se remueven para dejar expuesto el cráneo. Con la ayuda de pinzas-gubias se van retirando lentamente pequeñas fracciones de hueso hasta extraer toda la parte dorsal del cráneo. Al traccionar con las pinzas-gubia se debe tener mucha precaución para evitar daños en el encéfalo.

Una vez eliminado el cráneo, se cortan y apartan cuidadosamente las meninges. Por último se desprende el encéfalo de la cavidad craneana cortando las adherencias y pares craneales. Se debe tener especial cuidado en la zona olfatoria, que se encuentra adherida por un gran número de fibras nerviosas que atraviesan la placa cribiforme en la zona rostroventral.

## # ENCASTRADO/INCLUSIÓN Y OBTENCIÓN DE SECCIONES

El procedimiento seguido para el encastrado y corte se realizó en función de los posteriores estudios y análisis. Así, los diferentes bloques rostrales del encéfalo, que contenían los bulbos olfatorios, fueron separados en dos grupos en función del tipo de sección que se deseaba obtener.

### **Seccionado por congelación en Criostato**

Para el estudio a microscopía óptica se realizaron secciones coronales de 30  $\mu\text{m}$  de grosor de bulbos deprivados, contralaterales a la deprivación y controles, mediante el uso de un criostato (Leica CM1850). Para ello, el tejido fue crioprotegido mediante inmersión en sacarosa al 30% (p/v) en TF a 4°C en agitación hasta que el bloque de tejido quedaba completamente sumergido (16 h aproximadamente). Posteriormente el bloque se colocó sobre un porta-piezas cuyo vástago se encontraba sumergido en N<sub>2</sub> líquido y fue encastrado recubriéndolo con un medio comercial que se endurece al congelarse (Jung Tissue Freezing Medium). Una vez encastrado, se procedía al seccionado recogiendo las secciones de 30  $\mu\text{m}$  de grosor de forma seriada en TF frío (4°C). Estas secciones se conservaban a 4°C en TF con azida sódica al 0,05% hasta su posterior uso.

### **Seccionado en Vibratomo**

Para estudios complementarios a microscopía óptica y para los estudios ultraestructurales, algunos de los bloques de tejido de bulbos deprivados, contralaterales a la deprivación y controles fueron seccionados por medio de un vibratomo. Para ello se preparó un medio de encastrado compuesto por agar-agar al 5% en agua destilada. Una vez mezclado el agar-agar con el agua, se lleva a ebullición, se remueve la mezcla y se deja enfriar. Cuando la mezcla alcanza unos 40°C se sumerge el bloque de tejido y se deja que la mezcla llegue a T<sup>a</sup> ambiente, a la cual adquiere la consistencia suficiente para permitir el corte del tejido.

Posteriormente se obtuvieron secciones coronales de 60  $\mu\text{m}$  de grosor en un

vibratomo (Leica VT1000M) que se recogieron de forma seriada en TF y fueron almacenadas a 4°C en TF con azida sódica al 0,05% hasta su uso.

### **Seccionado en Ultramicrotomo**

El ultramicrotomo fue utilizado para realizar estudios complementarios tanto a microscopía óptica como electrónica, sobre secciones semifinas (1,5  $\mu\text{m}$ ) o sobre secciones ultrafinas (50-80 nm) respectivamente, de los diferentes grupos experimentales. En ambos casos partimos de secciones previamente obtenidas en el vibratomo y sobre las que ya se había realizado la técnica inmunohistoquímica para la detección de mGluR1a mediante el método ABC (ver más adelante).

Así, una vez demostrado sobre las secciones el antígeno de nuestro interés, mediante el uso de 3,3' diaminobenzidina (DAB) como cromógeno, las secciones se sumergieron durante 1 h a T<sup>a</sup> ambiente en OsO<sub>4</sub> al 1% y glucosa al 7% en TF. Por medio de este tratamiento se consigue una óptima fijación de las membranas celulares, a la vez que se incrementa su contraste para su observación a microscopía electrónica. El OsO<sub>4</sub> reacciona primariamente con moléculas lípidicas. Las insaturaciones de los ácidos grasos son oxidadas por el OsO<sub>4</sub>, el cual, a su vez, es reducido a osmio metálico, formando un precipitado opaco que añade densidad y contraste al tejido a observar. De este modo, actúa como fijador y agente contrastante del tejido. Por otra parte, la reacción del OsO<sub>4</sub> con la DAB producirá un complejo OsO<sub>2</sub>-DAB que incrementa el contraste del precipitado tanto para estudios de microscopía óptica como electrónica.

Tras toda una serie de lavados en TF frío, se procedió a incluir las secciones en resina epoxi (Durcupan, Fluka) para lo cual se comenzó con una deshidratación por pasos por etanol frío de graduación creciente (50°-70°-80°-90°-96°-100°-100°) de 10 min cada uno a la que siguió un aclarado en óxido de propileno (2x10min). Con el fin de asegurar la penetración de la resina en el tejido, las secciones se sometieron a tres pasos de una mezcla de óxido de propileno-resina en proporción 3:1, 2:2, 1:3 de 3 h cada uno, para finalmente pasarlas a resina pura donde permanecieron a T<sup>a</sup> ambiente durante toda la noche. A la mañana siguiente las secciones fueron montadas

sobre portaobjetos en la propia resina y cubiertas con cubreobjetos. Sobre el cubreobjetos se colocó un contrapeso para asegurar que las secciones quedaran completamente planas y se realizó la polimerización de la resina durante 24 h a 60°C.

Para la realización de secciones semifinas y ultrafinas, una vez estudiados los portaobjetos y seleccionadas las secciones de interés, se procedió a levantar el cubreobjetos y eliminar cuidadosamente la resina de alrededor de la sección de interés con una hoja de escalpelo fina. Posteriormente se colocó sobre la sección una gota de resina sin polimerizar y, sobre ella, un vástago de resina previamente polimerizada, llevándose a la estufa a 60°C durante 24 h. Una vez conseguida la polimerización, el portaobjetos se acerca a la superficie de un contenedor con N<sub>2</sub> líquido (evitando el contacto directo) y traccionando lateralmente se consigue despegar del cristal del portaobjetos el vástago, con la sección plana en su extremo.

Estas piezas fueron llevadas al ultramicrotomo (Reichert-Jung Ultracut E) para la obtención de cortes semifinos (1,5 µm) con una cuchilla con filo de diamante (Histo 45°, Diatome). Estas secciones semifinas generalmente comprendían toda una sección coronal del bulbo olfatorio.

En el caso de la obtención de secciones ultrafinas, se procedía inicialmente como para el caso de las secciones semifinas. Una vez obtenidos los bloques, en cuyo extremo se encontraba la sección, éstos fueron cuidadosamente analizados bajo microscopio donde se seleccionó la región específica de interés. A continuación se procedió al desvastado de la pieza para eliminar los restos de tejido. Finalmente, tras la comprobación al microscopio de que el bloque contenía específicamente la zona de interés, se realizaron los cortes ultrafinos (50-80 nm de grosor) mediante el uso de una cuchilla con filo de diamante (Ultra 35°, Diatome) a una velocidad de desplazamiento del brazo del ultramicrotomo de 2mm/s. Las secciones ultrafinas, en flotación sobre la balsa de agua de la cuchilla, fueron estiradas por exposición a vapores de cloroformo, acercándoles un bastoncillo de algodón empapado en cloroformo, y fueron posteriormente recogidas sobre rejillas de ojal de cobre recubiertas con una película de formvar.



## # TINCIONES

### Tinción de Nissl sobre secciones de vibratomo

Con objeto de analizar la histología general de las secciones de bulbo olfatorio, en una serie de cada bulbo de cada animal se llevó a cabo la tinción de Nissl. Para ello seguimos el siguiente protocolo:

1.- Las secciones se montaron sobre portas gelatinizados y se dejaron secar durante toda la noche en un lugar protegido del polvo.

2.- Inmersión de los portaobjetos con las secciones durante toda la noche en una jarra Coplin con una solución de etanol absoluto/cloroformo 1:1, seguida de una rehidratación a través de una serie de etanol de graduación decreciente hasta agua destilada. En este paso se produce un desengrasado del tejido, lo cual redundará en una disminución del marcaje de fondo.

3.- Tinción durante 5-10 min en una solución de violeta de cresilo al 0,1% a 37°C. El realizar la tinción en caliente mejora la penetración del colorante.

#### Solución de violeta de cresilo al 0,1%

Violeta de cresilo	0,1 g
Agua destilada	100 ml
Ácido acético glacial	0,3 ml

El ácido acético se añade justo antes de realizar la tinción y se filtra la mezcla.

4.- Lavado rápido en agua destilada.

5.- Diferenciación en etanol 96% durante aproximadamente 10 min controlando el resultado bajo el microscopio.

6.- Deshidratación en etanol absoluto (2x5 min), aclarado en xilol (2x5 min) y montaje en Entellán (Merck).

### Método inmunohistoquímico

Las secciones de criostato o de vibratomo pertenecientes a bulbos deprivados, contralaterales a la deprivación y controles fueron lavadas en TF tres veces, 10 min cada vez, a T<sup>a</sup> ambiente y en agitación constante.

Las secciones de vibratomo destinadas a ser analizadas a microscopía electrónica fueron crioprotegidas mediante inmersión durante 1 h a T<sup>a</sup> ambiente en una mezcla de sacarosa 30% (p/v) y glicerol 10% (v/v) en TF y posteriormente fueron sometidas a 3 procesos de congelación-descongelación colocándolas sobre una superficie metálica que se aproximaba a un recipiente que contenía N<sub>2</sub> líquido. Este tratamiento facilitará la penetración de los anticuerpos, sin producir excesivo daño en las membranas. Tras el tratamiento, estas secciones fueron lavadas (3x10 min) en TF y se realizó sobre ellas la técnica inmunohistoquímica del mismo modo que para el resto de las secciones, con la única salvedad de que se excluyó de las incubaciones el uso de Triton X-100 para evitar excesivo daño en las membranas celulares.

Así, el método inmunohistoquímico general se desarrolló del siguiente modo. Previo a las incubaciones propias de este método los cortes se introdujeron durante 60 min a T<sup>a</sup> ambiente en una solución de preincubación constituida por:

- Tampón fostato 0,1 M, pH 7,3.

- Triton X-100 al 0,2% (p/v).

- Suero normal al 5% (suero de la misma especie a partir de la cual se han obtenido los anticuerpos secundarios a utilizar).

El Triton X-100 (*p*-isooctilfenoxi-poli-etoxietanol) disuelve las membranas lipídicas favoreciendo la penetración de los anticuerpos así como de los demás componentes involucrados en la reacción inmunohistoquímica. El suero normal hace que disminuyan las uniones inespecíficas.

A continuación tuvo lugar la incubación en el anticuerpo primario. En una serie de cada uno de los bulbos (deprivados, contralaterales a la deprivación y controles) de todos los animales se realizó la detección inmunohistoquímica de tirosina hidroxilasa para poder determinar, mediante la reducción de su expresión en el bulbo deprivado, la efectividad del proceso de deprivación. El anticuerpo primario anti-tirosina hidroxilasa era un anticuerpo monoclonal producido en ratón (Sigma, T2928). Igualmente, en cada uno de los bulbos procedentes de todos los animales se realizó la detección de nuestro antígeno de interés, mGluR1a mediante el uso de un anticuerpo monoclonal producido en ratón dirigido específicamente contra el mGluR1a de rata

(BD Biosciences, 556389). Estas incubaciones se realizaron en agitación constante durante 48 horas a 4°C. La solución de incubación estaba formada por los mismos componentes que el medio de preincubación, en el que fueron diluidos los anticuerpos primarios (1:10.000 para el anti-tirosina hidroxilasa y 1:500 para el anti-mGluR1a). Finalizado este periodo de incubación, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TF a T<sup>a</sup> ambiente y en agitación constante, destinados a eliminar los restos de anticuerpo primario no unido al tejido.

Posteriormente, las secciones fueron sumergidas, durante una hora y a T<sup>a</sup> ambiente, en un medio de incubación que contenía un anticuerpo secundario biotinado. Tanto para la detección de tirosina hidroxilasa como para la de mGluR1a, la solución de incubación estaba compuesta por la IgG biotinada de cabra anti-IgG de ratón (Jackson Immunoresearch) diluida 1:500 en TF. Tras este periodo de incubación, las secciones fueron lavadas de igual modo que en el caso anterior: 3 lavados de 10-15 min en TF a T<sup>a</sup> ambiente y en agitación constante.

Una vez eliminado el anticuerpo secundario sobrante, las secciones fueron incubadas durante una hora en agitación constante y a T<sup>a</sup> ambiente en un medio que contenía el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC Elite Kit, Vector). El medio fue preparado 45 minutos antes de su utilización y guardado en oscuridad. Tras esta incubación se llevaron a cabo 3-4 lavados de 10 min cada uno en TF.

Los elementos tisulares que expresaban los antígenos de interés fueron puestos de manifiesto sumergiendo los cortes en una solución de revelado compuesta por:

- Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,3.

- Agua oxigenada, (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 0,003%. Es el sustrato de la peroxidasa. Cuando la reacción tiene lugar se libera oxígeno.

- 3,3'diaminobencidina, (DAB) al 0,03%, utilizada como cromógeno. Este compuesto se oxida con el oxígeno liberado por la peroxidasa y precipita proporcionando un color marrón.

La reacción fue controlada bajo el microscopio y se interrumpió mediante varios lavados con TF frío cuando los elementos positivos alcanzaron un grado óptimo de tinción respecto al fondo.

Tras el revelado y posterior lavado, los cortes destinados exclusivamente a su estudio a microscopía óptica, fueron colocados sobre portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar durante una noche a T<sup>a</sup> ambiente, y posteriormente fueron deshidratados introduciéndolos en una batería de alcoholes de graduación creciente (5 min en alcoholes de 70°-80°-90° y 96° y dos pasos de 10 min cada uno en alcohol de 100°). Finalmente, las secciones se aclararon mediante dos inmersiones, de 10 min cada una en xilol y, a continuación, las preparaciones se recubrieron con un poliestireno sellador soluble en xilol, Entellan (Merck), sobre el que se colocó un cubreobjetos.

### **Especificidad de los anticuerpos**

El anticuerpo primario anti-tirosina hidroxilasa (Sigma, T2928) es un anticuerpo monoclonal constituido por IgGs de ratón obtenido de líquido ascítico a partir de células PC-12 de feocromocitoma de rata.

El anticuerpo primario anti-mGluR1a (BD Biosciences, 556389) es un anticuerpo monoclonal constituido por IgGs de ratón (clon G209-2048) dirigidas frente a una secuencia al dominio carboxi-terminal del mGluR1a de rata y no presenta reactividad cruzada con ninguna otra isoforma de mGluR1.

### **Controles inmunohistoquímicos**

Con objeto de comprobar la especificidad de la técnica utilizada se realizaron los siguientes controles:

1. Omisión del anticuerpo primario para detectar posibles uniones inespecíficas del anticuerpo secundario.
2. Incubación exclusivamente con el medio de revelado para detectar la posibilidad de existencia de peroxidasas endógenas en el tejido.

En ninguno de los casos detectamos reacciones positivas.

### **Contratinción de Azul de Toluidina sobre secciones semifinas**

Las secciones que estaban destinadas a ser montadas en resina para su posterior seccionamiento en cortes semifinos o ultrafinos fueron adicionalmente tratadas del siguiente modo como ya se describió en el apartado Seccionamiento. Brevemente, una vez revelada la inmunohistoquímica para el antígeno de nuestro interés, mediante el uso de DAB como cromógeno, las secciones se sumergieron durante 1 h a T<sup>a</sup> ambiente en OsO<sub>4</sub> al 1% y glucosa al 7% en TF.

Tras toda una serie de lavados en TF frío, las secciones se deshidrataron mediante pasos por etanol frío de graduación creciente (50°-70°-80°-90°-96°-100°-100°) de 10 min cada uno a la que siguió un aclarado en óxido de propileno (2x10min). Después las secciones se sometieron a tres pasos de una mezcla de óxido de propileno-resina 3:1, 2:2, 1:3 de 3 horas cada uno, para facilitar la penetración de la resina, y finalmente se colocaron en resina pura durante toda la noche a T<sup>a</sup> ambiente. Finalmente las secciones fueron montadas sobre portaobjetos en la propia resina y cubiertas con cubreobjetos. Sobre el cubreobjetos se colocó un contrapeso para asegurar que las secciones quedaran completamente planas y se realizó la polimerización de la resina durante 24 h a 60°C.

Como se ha apuntado anteriormente, tras su estudio, estas secciones se reincluyeron para obtener secciones semifinas y ultrafinas. En el caso de las secciones semifinas, éstas fueron contrateñidas con azul de toluidina para facilitar la localización, en las diferentes capas bulbares, de los elementos inmunomarcados mediante la técnica inmunohistoquímica.

Para realizar esta contratinción seguimos el siguiente protocolo:

- 1.- Las secciones de 1,5 µm obtenidas en el ultramicrotomo fueron recogidas cuidadosamente de la balsa de agua de la cuchilla y colocadas sobre gotas de agua destilada depositadas sobre un portaobjetos que se encontraba sobre una placa calefactora a 55°C.
- 2.- Inmediatamente después de colocar la sección sobre la gota de agua se acerca un bastoncillo de algodón, impregnado en cloroformo, a la superficie de la sección (sin llegar a contactar). Los vapores de cloroformo hacen que las secciones se

estiren.

3.- Una vez evaporada el agua, y con las secciones estiradas adheridas al portaobjetos, se cubren con la solución de azul de toluidina/bórax, manteniéndose sobre la placa calefactora unos minutos (hasta que empiezan a emitir vapores).

Solución de azul de toluidina/Bórax

Azul de toluidina	4 g
Bórax (tetraborato sódico)	5 g
Agua destilada	500 ml

El ácido acético se añade justo antes de realizar la tinción y se filtra la mezcla.

4.- Se diferencia el azul de toluidina lavando las secciones en agua.

5.- Secado de las secciones en estufa a 37°C.

6.- Paso rápido por etanol absoluto (1x2 min), aclarado en xilol (2x5 min) y montaje en Entellán (Merck).

### **Contrastado de cortes ultrafinos sobre rejillas**

La fase previa a la observación de las secciones al microscopio electrónico de transmisión consiste en conferir, a los cortes obtenidos, un contraste adicional al aportado por el OsO<sub>4</sub> utilizado anteriormente. Para esto se utilizan soluciones de sales de metales pesados (usualmente Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo), las cuales contienen iones de alto número atómico, es decir, con un importante número de electrones capaces de desviar el haz de electrones incidente sobre la muestra, y con cierta afinidad por componentes específicos de la misma. Esto permite incrementar la densidad electrónica de los mismos y así ganar contraste.

Para realizar el contrastado se prepara una placa de Petri (de diámetro grande) en la que se pone papel de filtro húmedo en el fondo y lentejas de NaOH por todo alrededor. Sobre el papel de filtro se coloca un trozo de parafilm. A continuación se colocan filas de gotas de los líquidos necesarios sobre el parafilm. Sobre cada fila de gotas se irá desplazando una de las rejillas, colocándola sobre las gotas por la cara en la que se encuentran los cortes.

Es importante mantener, durante todo el proceso, la placa de Petri abierta sólo

el tiempo necesario. Así se minimiza la entrada de  $\text{CO}_2$  y se evita, en lo posible, la formación de precipitados de plomo.

#### Realización

- Paso por una gota que contiene acetato de uranilo (2%) en etanol al 50% durante 10 minutos. (la solución debe ser centrifugada 5 minutos antes de usar). El acetato de uranilo fue introducido por Watson (1958) y puede ser preparado en solución alcohólica o acuosa.
- Lavado en una gota de etanol 50% (5 min) para eliminar el acetato de uranilo.
- Lavado en tres gotas sucesivas de agua destilada (5 min en cada gota)
- Paso por una gota de citrato de plomo (Reynolds, 1963) 10 min.  
(la solución debe ser centrifugada 5 min antes de usar)

<u>Citrato de Plomo</u>		
Nitrato de plomo $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	1,33 g	
Citrato sódico $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,76 g	
Agua destilada hervida	30 ml	
Hidróxido sódico 1N en agua destilada hervida (4 g de NaOH en 10 ml de agua)	8 ml	

#### PREPARACIÓN:

- Añadir el nitrato de plomo y el citrato sódico en los 30 ml de agua destilada hervida. (El agua destilada debe ser previamente hervida y enfriada para eliminar el  $\text{CO}_2$ , allí disuelto y así evitar precipitados de plomo).
  - Agitar fuertemente durante 1 minuto y posteriormente a intervalos de 5 minutos hasta 30 minutos. En este intervalo la solución adquirirá un aspecto lechoso.
  - Añadir los 8 ml de hidróxido sódico 1N y agitar hasta obtener una solución transparente
  - Completar con agua destilada hervida hasta 50 ml.
- 
- Lavado en tres gotas sucesivas de agua destilada (5 min en cada gota)
  - Finalmente se seca con cuidado el agua sobrante de cada rejilla con el extremo de un papel de filtro y se colocan en el portarejillas hasta su observación.

### **Método inmunofluorescente**

Mediante dobles marcajes por inmunofluorescencia para mGluR1a, en combinación con otros marcadores, realizamos la caracterización de los elementos positivos a mGluR1a. Los marcadores utilizados en combinación con mGluR1a fueron aquellos que consideramos, basados en la bibliografía al respecto, que podrían presentar, en mayor o menor medida, coexpresión con el receptor. De este modo podríamos definir más profundamente la naturaleza de los elementos positivos a mGluR1a e inferir, en lo posible, la participación de éstos en la circuitería bulbar. Con este fin estudiamos la posible coexpresión del receptor mGluR1a con: i) el transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2) que pone de manifiesto elementos de naturaleza glutamatérgica, ii) tirosina hidroxilasa, calbindina D-28k y calretinina como marcadores de los subtipos más numerosos de cPGs, y iii) con neurocalcina y colecistoquinina como marcadores de una importante población de células empenachadas, cEEs para la primera y cES y cEM la segunda.

Para posibilitar las distintas combinaciones utilizamos dos diferentes anticuerpos frente a mGluR1a en cada caso: un anticuerpo monoclonal generado en ratón frente a mGluR1a (BD Biosciences, Cat. 556389) o un anticuerpo policlonal anti-mGluR1a generado en conejo (Tocris, Cat. 2028). Ambos anticuerpos ofrecen marcajes idénticos y van dirigidos específicamente frente a mGluR1a, no presentando reacción cruzada con ninguna otra isoforma de mGluR1. Las referencias y concentraciones de uso de todos los anticuerpos aparecen reflejadas en la Tabla 1.

Para la realización de la técnica, las secciones se lavaron tres veces en TF, durante 10 min cada vez. Previo a las incubaciones, los cortes se sumergieron durante 20 min, en agitación constante, en una solución de borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ) al 1% en TF. El borohidruro sódico es un agente reductor que actúa sobre los grupos aldehído presentes en el tejido por el uso del fijador y los reduce a grupos hidroxilo, eliminando así la autofluorescencia propia de los grupos aldehído.

Tras una serie de lavados en TF para eliminar completamente los restos de borohidruro sódico, las secciones fueron incubadas durante 60 min a T<sup>a</sup> ambiente en la misma solución de preincubación descrita en el apartado "método



inmunohistoquímico”.

A continuación tuvo lugar la incubación con las diferentes combinaciones de anticuerpos primarios. En éstas se combinó el anticuerpo dirigido contra mGluR1a con cada uno de los dirigidos frente al resto de antígenos de interés. Esta incubación se realizó en agitación constante durante 48 horas a una temperatura de 4°C. La solución de incubación estaba formada por los mismos componentes que el medio de preincubación al que se añadieron los anticuerpos primarios. La dilución de los anticuerpos primarios en esta solución estuvo siempre en el rango de dilución recomendada por la casa comercial suministradora de los mismos. No obstante, en todos los casos, ésta fue ajustada para su uso con nuestro material, de modo que obtuviéramos la mejor relación señal/marcaje de fondo. Las diluciones finales elegidas para la realización del presente trabajo se detallan en la Tabla 1.

Finalizado el periodo de incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TF a T<sup>a</sup> ambiente y en agitación constante. A continuación las secciones se incubaron durante 2 horas, en agitación constante, a T<sup>a</sup> ambiente, y en oscuridad, en una combinación de anticuerpos secundarios diluidos 1:500 en TF. Los anticuerpos secundarios, dirigidos frente a la fracción constante de las IgGs utilizadas como anticuerpos primarios se encontraban conjugados con partículas fluorescentes, DyLight 488 o cianina Cy3 (Jackson Immunoresearch). En algunos casos se utilizó como anticuerpo secundario IgG de burro biotinada anti-IgG de cobaya. La naturaleza de los anticuerpos y la concentración a la que se utilizaron se indica en la Tabla 1. Concluidas las 2 horas de incubación se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno en TF, en oscuridad.

En el caso de usar como anticuerpo secundario IgG de burro biotinada anti-IgG de cobaya, se realiza una tercera incubación, de 1 h a T<sup>a</sup> ambiente, en streptavidina conjugada con DyLight 488 (Jackson Immunoresearch) diluida 1:2000 en TF. Posteriormente se realizaron 3 lavados de las secciones, en oscuridad, de 10 minutos cada uno, en TF. Seguidamente las secciones se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se cubrieron con un medio adecuado para preservar la fluorescencia (Gel Mount, G0918, SIGMA), se colocaron los cubreobjetos y fueron sellados los

bordes para maximizar la conservación de las muestras.

<b>Anticuerpos Primarios</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Dilución</b>
IgG Ratón anti-mGluR1a	BD Biosciences (Cat. 556389)	1:500
IgG Conejo anti-mGluR1a	Tocris (Cat. 2028)	1:250
IgG Cobaya anti-VGluT2	Synaptic Systems (Cat. 135404)	1:250
IgG Ratón anti-Calbindina D-28k	Swant (Cat. 300)	1:2.000
IgG Ratón anti-Calretinina	Swant (Cat. 6B3)	1:5.000
IgG Ratón anti-Tirosina hidroxilasa	Sigma (Cat. T2928)	1:10.000
IgG Conejo anti-Neurocalcina	Nakano y cols., 1992	1:3.000
IgG Ratón anti-Colecistoquinina	CURE/UCLA (#9303)	1:1.000

<b>Anticuerpos Secundarios</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Dilución</b>
IgG Cabra anti IgG ratón biotinado	Jackson (Cat. 115-065-146)	1:500
IgG Burro anti IgG cobaya biotinado	Jackson (Cat. 706-065-148)	1:500
IgG Burro anti IgG ratón DyLight 488	Jackson (Cat. 715-485-151)	1:500
IgG Burro anti IgG ratón Cy3	Jackson (Cat. 715-165-150)	1:500
IgG Burro anti IgG conejo DyLight 488	Jackson (Cat. 711-485-152)	1:500
IgG Burro anti IgG conejo Cy3	Jackson (Cat. 711-165-152)	1:500
Streptavidina DyLight 488	Jackson (Cat. 016-480-084)	1:2.000

Tabla 1: Tabla en la que se recogen los datos referentes a los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el presente estudio.

### **Especificidad de los anticuerpos**

El anticuerpo primario anti-mGluR1a (BD Biosciences, 556389) es un anticuerpo monoclonal constituido por IgGs de ratón (clon G209-2048) dirigidas frente a una secuencia del dominio carboxi-terminal del mGluR1a de rata y no presenta reactividad cruzada con ninguna otra isoforma de mGluR1.

El anticuerpo primario anti-mGluR1a (Tocris, 2028) es un anticuerpo policlonal constituido por IgGs de conejo dirigidas frente al péptido sintético correspondiente

a los aa 1180-1199 del extremo carboxi-terminal del mGluR1a de rata. No presenta reactividad cruzada con ningún otro mGluR

El anticuerpo primario anti-VGLUT2 (Synaptic Systems, 135404) es un anticuerpo policlonal compuesto por IgGs de cobaya dirigidas frente a la proteína recombinante formada por los aa 510-582 del VGLUT2 de rata y detecta específicamente la isoforma 2 de los VGLUT.

El anticuerpo primario anti-Calbindina D-28k (Swant, 300) es un anticuerpo monoclonal constituido por IgGs de ratón producidas por hibridación de células de mieloma de ratón con células del bazo de ratones inmunizados con calbindina D-28k purificada del intestino de pollo. Este anticuerpo no presenta reactividad cruzada con calretinina ni con ninguna otra proteína ligante de calcio conocida.

El anticuerpo primario anti-calretinina (Swant, 6B3) es un anticuerpo monoclonal constituido por IgGs de ratón que reconoce el epítipo localizado dentro de los 4 dominios "EF-hand" comunes a las isoformas de calretinina. No presenta reactividad cruzada con calbindina D-28k ni con ninguna otra proteína ligante de calcio conocida.

El anticuerpo primario anti-tirosina hidroxilasa (Sigma, T2928) es un anticuerpo monoclonal constituido por IgGs de ratón obtenido de líquido ascítico a partir de células PC-12 de feocromocitoma de rata.

El anticuerpo primario anti-neurocalcina fue suministrado por los Dres. Katsuo Okazaki e Hiroyoshi Hidaka del Departamento de Farmacología del *Nagoya University School of Medicine* (Japón). Es un anticuerpo policlonal constituido por IgGs de conejo dirigidas frente a neurocalcina y que ha sido completamente caracterizado (Nakano y cols., 1992) no presentando reactividad cruzada con ninguna otra proteína ligante de calcio.

El anticuerpo primario anti-colecistoquinina (Cure Antibody Laboratory #9303) fue suministrado por el Dr. Gordon V. Ohning del *Cure Digestive Diseases Research Center*, de la Universidad de California (EEUU). Es un anticuerpo monoclonal constituido por IgGs de ratón dirigidas específicamente frente a colecistoquinina.

## # ANÁLISIS Y DOCUMENTACIÓN

Las secciones fueron examinadas en un fotomicroscopio (Zeiss AxioScope A.1) equipado con campo claro y epifluorescencia, conectado a una cámara digital (Zeiss HRc), la cual, a su vez, estaba acoplada a un soporte informático con el software adecuado (Zeiss AxioVision 4.8).

En el caso de las secciones ultrafinas, éstas fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM902 y documentadas mediante una cámara digital acoplada a dicho microscopio. Todas las imágenes fueron capturadas en las mismas condiciones de voltaje y compensación.

En todos los casos las imágenes digitales fueron procesadas con el software Adobe Photoshop CS2 (v. 9.0) con el que se realizaron únicamente ajustes de resolución y ligeras modificaciones de brillo y contraste para unificar las características de las imágenes.

## RECUESTO CELULAR Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El recuento celular de elementos positivos se realizó a través de fotomicrografías obtenidas de 8 bulbos de cada grupo experimental, de cada uno de los cuales se seleccionaron 5 secciones y de cada sección se tomaron imágenes de 3 cuadrantes al azar con el objetivo de 10x. Cada una de las imágenes obtenidas correspondía a una superficie de tejido de 1,5 mm<sup>2</sup>. De este modo se realizó el recuento de células en 120 cuadrantes por cada grupo experimental. En cada una de estas imágenes se incluyeron en el recuento sólo aquellas células positivas cuyas características morfológicas permitían que fueran identificadas sin ningún tipo de dudas como pertenecientes al tipo celular de interés.

Los datos así obtenidos se analizaron estadísticamente por medio del software SPSS v.18 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EEUU) mediante el test no-paramétrico de los signos de Wilcoxon para datos dependientes, al que posteriormente se le aplicó la corrección de Bonferroni para contrarrestar la detección de diferencias derivadas de la realización de múltiples comparaciones. El

nivel mínimo de significación se fijó en el 95% por lo que hemos considerado diferencias significativas a las que los valores de  $p < 0,05$  y como altamente significativos los valores de  $p < 0,01$ .

### 2.3.- ESTUDIO PROTEÓMICO

El estudio proteómico estaba centrado en la obtención de fracciones enriquecidas en el receptor, para su posterior análisis en electroforesis SDS-PAGE y Western-blotting. A este respecto hay que subrayar que mientras la mayoría de las proteínas citosólicas y de carácter hidrofílico suelen ser de fácil extracción, el mGluR1a es una proteína con numerosas regiones hidrofóbicas y con siete dominios transmembrana, lo cual dificulta su estudio mediante estas técnicas.

Las dificultades en la investigación de complejos proteicos de membrana radican en la propia naturaleza de las proteínas de membrana. Éstas son altamente hidrofóbicas y sus regiones transmembrana establecen una estrecha relación con los lípidos de membrana para mantener la estabilidad del complejo. El aislamiento de los complejos proteicos normalmente requiere la disyunción de la membrana en la que se encuentran insertados. Las proteínas de membrana fuera de esta plataforma física tienden a la agregación, adsorción y precipitación en solventes acuosos, lo que conlleva una pérdida de muestra y dificulta su análisis con ciertas técnicas como las electroforéticas.

En nuestro caso, la proteína que pretendemos estudiar, además de presentar siete dominios transmembrana, presenta la particularidad de poder aparecer en estado dímérico o monomérico, lo que supone encontrarse en estado activo o inactivo respectivamente. Por ello, consideramos fundamental para nuestro estudio no sólo el determinar las modificaciones en la expresión de mGluR1a en las condiciones experimentales a analizar, sino también determinar el ratio dímero/monómero en cada uno de los casos. Estas pretensiones suponen, obviamente, una mayor complejidad a la hora de realizar el análisis proteómico ya que a la complejidad de la extracción y solubilización inherente a una proteína transmembrana, se le añade el hándicap de realizar el análisis proteómico preservando, de modo fiel, las formas díméricas y monoméricas del receptor.

El ambiente lipídico que rodea a los complejos proteicos de membrana proporciona un ambiente hidrofóbico estable para las regiones intermembrana, favoreciendo la interacción entre ellas y estabilizando la estructura del complejo.

Para el aislamiento y análisis de los complejos de membrana, se hace indispensable, por lo tanto, disponer de una serie de agentes que permitan la extracción y solubilización de estas estructuras hidrofóbicas del ambiente lipídico que los rodea, minimizando en la medida de lo posible la alteración estructural de los mismos (Hooker y cols., 2007).

Los agentes caotrópicos y los detergentes son utilizados extensamente en biología molecular para la solubilización de proteínas. Los agentes caotrópicos (urea, thiourea) son agentes desnaturizantes que estabilizan estados desplegados de las proteínas mediante enlaces no covalentes. Los detergentes son moléculas anfipáticas que contienen dominios hidrofóbicos e hidrofílicos. Esta estructura permite su autoasociación (como la formación de micelas) uniéndose a superficies hidrofóbicas como las encontradas en los dominios transmembrana. Los detergentes, en un sentido amplio, imitan el comportamiento de los lípidos, y se distinguen por la concentración a la que se autoasocian o el tipo de estructuras que forman.

Existen cuatro tipos principales de detergentes en función de su capacidad para solubilizar y desnaturizar proteínas integrales de membrana (Speers y Wu, 2007): i) iónicos de cadena lineal, ii) no iónicos, iii) ácidos biliares, iv) zwitteriónicos. Los agentes caotrópicos, los detergentes iónicos de cadena lineal (como el dodecilsulfato sódico [SDS]), y los detergentes zwitteriónicos son sustancias fuertemente desnaturizantes, por lo que no son apropiadas para el estudio de complejos proteicos. Únicamente los detergentes no iónicos y los ácidos biliares son apropiados, debido a su moderado potencial de alteración de la membrana y por ser "desnaturizantes suaves". Los detergentes no iónicos más utilizados son el *n*-dodecil- $\beta$ -D-maltósido (DDM), el *p*-isooctilfenoxi-poli-etoxietanol (Triton X-100) y la digitonina (Kashino, 2003). Debido a que estos detergentes rompen preferentemente las interacciones lípido-lípido o lípido-proteína antes que interacciones proteína-proteína, son considerados detergentes suaves y, por lo tanto, apropiados para la solubilización de complejos proteicos nativos.

Por todo ello, hemos planteado nuestro estudio proteómico para SDS-PAGE (*SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) clásico de Laemmli (1970), tal como se

describe en los manuales "Protein Methods" (Bollag y cols., 1996) y "Current Protocols in Cell Biology" (Gallagher, 2007), descrito específicamente para realizar electroforesis en condiciones *desnaturalizantes*. Según este protocolo pretendemos determinar las alteraciones en la expresión del mGluR1a en cada uno de nuestros grupos experimentales.

En paralelo, y con el fin de determinar los diferentes estados de agregación del receptor en cada supuesto experimental, lo cual demostraría diferentes estados funcionales del mismo, hemos introducido variantes basándonos en lo descrito en algunos estudios (Kashino, 2003; Hooker y cols., 2007; Speers y Wu, 2007; Marzosa y cols., 2009). Estas variantes han ido dirigidas a preservar la estructura *nativa* de las proteínas, minimizando los inconvenientes de extracción y electroforesis que esta situación lleva implícita. Básicamente estas variaciones incluyen el uso de detergentes neutros "débilmente desnaturalizantes" como Triton X-100 y eliminar el uso de agentes reductores como el  $\beta$ -mercaptoetanol (que romperían los puentes disulfuro). En cualquier caso, estas modificaciones serán detalladas oportunamente.

Tras la electroforesis en condiciones desnaturalizantes o nativas se realizó la técnica del Western-blotting para poner de manifiesto la presencia de nuestro receptor. A continuación se detalla el protocolo seguido para la realización de este estudio.

### 2.3.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para el análisis proteómico de este estudio hemos utilizado 8 bulbos deprivados, 8 bulbos contralaterales a la deprivación y 8 bulbos control, pertenecientes a animales de 60 días de edad.

#### # DECAPITACIÓN Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

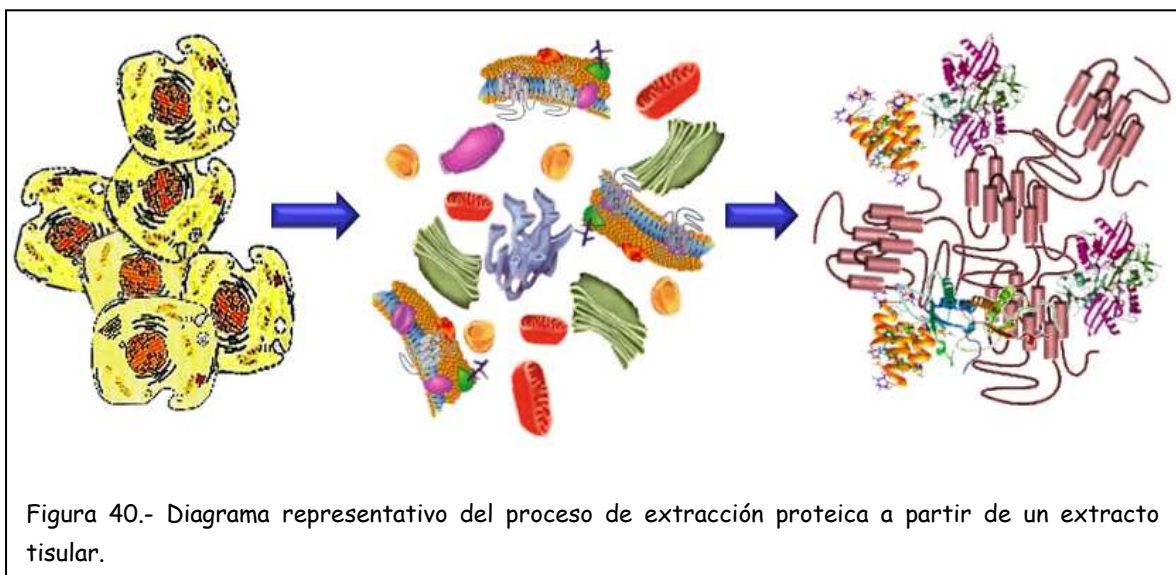
Los animales fueron anestesiados por medio de inhalación de isoflurano y rápidamente decapitados con una guillotina. Se procedió a abrir inmediatamente el cráneo con la ayuda de una pinza-gubia y los bulbos olfatorios fueron diseccionados,



extraídos y pesados en una báscula de precisión.

El proceso de extracción proteica se realizó mediante fraccionamiento, aplicando la combinación de diferentes técnicas como trituración, centrifugación, sonicación, choque osmótico y tratamiento con agentes solubilizantes como detergentes. Todo ello siguiendo los protocolos anteriormente mencionados a los que se introdujeron, en su caso, las modificaciones descritas por (Kashino, 2003; Hooker y cols., 2007; Speers y Wu, 2007; Marzoa y cols., 2009) para optimizar la extracción de proteínas en condiciones nativas.

En el desarrollo de la extracción proteica se pueden diferenciar dos grandes etapas. Primero, la obtención del extracto celular enriquecido y, posteriormente, la obtención de la fracción proteica a partir del extracto anterior. Antes de comentar con detalle cada uno de los procedimientos realizados en este apartado, mostramos un breve esquema del proceso general (fig. 40).



## # PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES.

El fraccionamiento celular consiste básicamente en los procesos de lisis, homogenización y separación de los componentes celulares.

Lisis celular: Los bulbos olfatorios, una vez extraídos y pesados, fueron rápidamente suspendidos en 500  $\mu$ l de solución de extracción por cada 50 mg de tejido. La solución de extracción o lisis estaba formada por tampón de lisis o

solubilización suplementado con inhibidores de proteasas.

El tampón de lisis es una solución hipotónica que produce una fragmentación preliminar de células por choque osmótico que, además, contiene agentes solubilizantes como detergentes (SDS para condiciones desnaturalizantes y Triton X-100 para condiciones nativas) y surfactantes como el EDTA que evita la actuación de proteasas, y sales que ayudan a precipitar las proteínas.

<b>TAMPÓN DE LISIS CONDICIONES DESNATURALIZANTES</b>	
Tris-HCl pH 8.0	20 mM
NaCl	137 mM
Glicerol	10%
EDTA	5 mM
SDS	1%

<b>TAMPÓN DE LISIS CONDICIONES NATIVAS</b>	
Tris-HCl pH 8.0	20 mM
NaCl	137 mM
Glicerol	10%
EDTA	5 mM
Triton X-100	2%

En ambos casos se añadió un cocktail de inhibidores de proteasas y de fosfatasa para evitar la actuación de las mismas:

<b>INHIBIDORES DE PROTEASAS</b>	
Soybean	50 $\mu$ M
Aprotinina	0,3 $\mu$ M
Leupeptina	50 $\mu$ M
TLCK (Tosilisinacolorometilcetona)	50 $\mu$ M
TPCK (Tosilfenilalanina clorometilcetona)	50 $\mu$ M
PMSF (Fenilmetilsulfonilfluoruro)	0,5 mM
Fenantrolina	5 mM
Pepstatina A	1 $\mu$ M
<b>INHIBIDORES DE FOSFATASAS</b>	
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1mM
NaF	1mM

Homogenización: Una vez suspendidos en el correspondiente tampón de lisis, los bulbos olfatorios fueron triturados para conseguir la disgregación celular

combinando la homogenización mecánica y manual. La primera se realizó con un homogenizador tipo Politron (Kinematica, Littau-Luzern, Switzerland), que fue aplicado a 8000 rpm en 3 ciclos de 15 s, para evitar el calentamiento de la muestra. Seguidamente se utilizó un homogenizador manual tipo *Potter-Elvehjem* (Afora, S.A., Madrid) que consta de un émbolo móvil que se ajusta perfectamente a las paredes de un tubo de cristal de tal manera que el tejido se disgrega al paso entre ambos elementos.

El extracto crudo total se mantuvo a T<sup>a</sup> ambiente durante 20 min, mezclando periódicamente la suspensión, para favorecer la lisis por acción del tampón de extracción. Además, para favorecer y aumentar la disgregación celular, el homogenado fue sonicado (3 ciclos de 20 s). La sonicación destruye las membranas celulares provocando rotura de células, y también produce la fragmentación de ácidos nucleicos.

Separación: Para la separación celular aplicábamos una centrifugación a 1000 x g durante 5 min en la que se eliminan los núcleos y restos celulares no lisados. Se tomó el sobrenadante y a continuación se centrifugó a 35.000 x g durante 40 min a 4°C para conseguir hacer precipitar las membranas celulares. Se tomó el pellet, que fue resuspendido en el correspondiente tampón de lisis, fue sonicado (5x10s) con intervalos de 2 min entre cada ciclo de sonicación y finalmente se dejó durante 15 min a T<sup>a</sup> ambiente. Finalmente se someten las muestras a una centrifugación a 16.000 x g durante 5 min y se recogen los pellets que fueron almacenados a -80°C hasta su utilización.

### 2.3.2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEÍCA

#### # MÉTODO COLORIMÉTRICO DE BRADFORD

El procedimiento, en general, consiste en determinar la concentración de la proteína a través del método colorimétrico de Bradford (Bradford y cols., 1976) y su posterior medida de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Los valores obtenidos se comparan con una recta estándar, dando valores relativos de la

concentración de proteínas totales en la muestra por comparación con la recta patrón.

El método colorimétrico de Bradford se basa en un cambio diferencial en la coloración de una sustancia colorante, Azul Brillante de Coomassie G-250, en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas (Bradford, 1976). La absorbancia máxima de una solución ácida de Coomassie cambia de 465 nm a 595 nm cuando tiene lugar la unión con proteínas (Reisner y cols., 1975).

Primero se elaboraron los estándares a partir de una disolución de BSA en agua 1mg/ml. A partir de aquí se elaboran los estándares con concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40 y 60  $\mu\text{g/ml}$  de BSA en un volumen total de 100  $\mu\text{l}$ . Debido a la interferencia de los detergentes usados en la extracción con la absorbancia, los estándares se realizaron por duplicado para cuantificar las proteínas extraídas con los dos medios de lisis diferentes (condiciones nativas o desnaturizantes) de modo que añadimos a los estándares, en cada caso, una cantidad de detergente equivalente a su concentración en el medio de extracción.

A continuación se tomaron 5  $\mu\text{l}$  de cada muestra (por triplicado en cada caso) y se completaron hasta 100  $\mu\text{l}$  con agua u.p. Posteriormente se diluye el Dye Reagent Concentrado (Bio-Rad) en 4 partes de agua u.p., se filtra con papel Whatman n° 1 y se añaden 5 ml del reagente a cada estándar a cada muestra, se agita, se deja reposar 10 min. y, a continuación, se procede a realizar la medición.

Tras establecer la recta patrón (para cada una de las condiciones) se mide la absorbancia de cada una de las muestras (por triplicado) extrapolando la absorbancia de las muestras a la recta patrón, obteniendo así la carga proteica total de cada muestra (como media de los tres valores obtenidos).

### 2.3.3.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Mediante la técnica de electroforesis de proteínas conseguimos la separación de las proteínas contenidas en una mezcla compleja en función de su tamaño, mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de un polímero (gel de acrilamida/bisacrilamida 29,2/0,8). Hemos realizado la electroforesis en condiciones tanto desnaturizantes como nativas en gel de poliacrilamida, aunque los geles para

ambas condiciones se elaboraron del mismo modo.

## # PREPARACIÓN DE LOS GELES

El protocolo de preparación de geles que hemos seguido estaba adaptado para la utilización de cubetas verticales con geles de tamaño de 7 cm x 8 cm x 1,5 mm (Mini Protean II, Bio-Rad). La preparación de los geles fue acorde al sistema de electroforesis discontinuo, en el que cada gel está conformado por dos tipos de gel, llamadas gel de empaquetamiento y gel de resolución, que presentan diferente concentración, composición y pH. Ambos se encuentran unidos pero limitados por una fase de separación. El gel de empaquetamiento se localiza en parte superior del sistema, formando los pocillos donde se depositan las muestras proteicas y el gel de resolución constituye el cuerpo del gel por donde migran y se separan las proteínas. El peso molecular esperado del mGluR1a (en forma monomérica y dimérica) hizo aconsejable el uso de un gel de bajo porcentaje (6%) para permitir la movilidad electroforética de esta proteína de elevado peso molecular.

	<b>Gel de empaquetamiento 4%</b>	<b>Gel de resolución 6%</b>
Acrilamida/Bis	0,67 ml	2 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8,8	-	2,5 ml
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1,3 ml	-
H <sub>2</sub> O u.p.	2,93 ml	5,3 ml
SDS 10%	50 µl	100 µl
Persulfato amónico 10%	50 µl	100 µl
TEMED	5 µl	8 µl

### Tampón Tris-HCl 1,5M pH 8,8

Trizma base (Sigma T6066)	18,165 g
Agua U.P.	60 ml

Ajustar con HCl a pH 8,8 y completar con agua u.p. hasta 100 ml.

### Tampón Tris-HCl 0,5M pH 6,8

Trizma base (Sigma T6066)	6,055 g
Agua U.P.	60 ml

Ajustar con HCl a pH 6,8 y completar con agua U.P. hasta 100 ml.

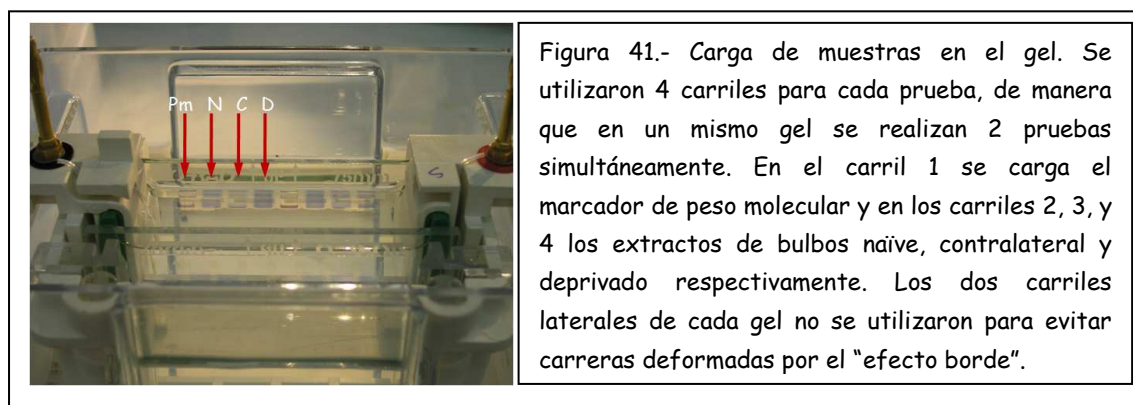
## # PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA ELECTROFORESIS

Una vez conocida la concentración de proteínas en las muestras, se resuspendió en el tampón de carga el volumen oportuno, en cada caso, para conseguir una carga homogénea de 60 µg de proteína total.

La composición del tampón de carga está detallada en la tabla adjunta. La composición para ambas condiciones es similar, salvo que en condiciones nativas se evita el uso de β-mercaptoetanol ya que es un agente reductor que rompería los enlaces disulfuro.

Condiciones Desnaturalizantes	Condiciones Nativas
Glicerol 10%	Glicerol 10%
β-mercaptoetanol 5%	-
SDS 2%	SDS 2%
Azul de Bromofenol 0,005%	Azul de Bromofenol 0,005%
Tris-HCl 0,0625M pH 6,8	Tris-HCl 0,0625M pH 6,8

La mezcla se agitó y se calentó ligeramente a 37°C durante 15 min. Tras una rápida centrifugación se realizó la carga de los pocillos del gel. Las muestras se cargaron en los distintos pocillos del gel, en uno de los cuales se incluyó el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope, Bio-Rad) con indicadores para las siguientes masas moleculares: 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 kDa (fig. 41)



## # ELECTROFORESIS

Se realizó en cámara fría y a un voltaje de 40V durante el tiempo en que las proteínas tardaron en abandonar el gel de empaquetamiento (unos 60 min) y posteriormente se aplicó un voltaje de 50V en el gel de resolución durante aproximadamente 180 min.

### Tampón de electroforesis:

25mM Tris	3,03 g
192mM glicina	14,4 g
0,1% SDS	

Ajustar hasta 1 litro con agua u.p. El pH debe ser de alrededor de 8,3. Usar el tampón frío.

### 2.3.4.- ELECTROTRANSFERENCIA

Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno) de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Immobilon P, Millipore). Para ello, tras activar la membrana mediante inmersión en metanol 30 s, ésta se estabiliza sumergiéndola en el tampón de transferencia durante 2-3 min. A continuación se realiza el *sandwich* con papel de filtro, el gel y la membrana, se añade el tampón de transferencia, se rodea la cubeta con hielo picado y se aplicó una corriente de 200mA durante aproximadamente dos horas y media en cámara fría. De este modo las proteínas van pasando del gel a la membrana atraídas por la carga eléctrica positiva, quedando inmovilizadas en la membrana en la misma posición que ocupaban en el gel.

### Tampón de transferencia

25mM Tris	3,03 g
192mM glicina	14,4 g
0,1% SDS	

Ajustar hasta 1 litro con agua u.p. El pH debe ser de alrededor de 8,3. Usar el tampón frío.

## # VISUALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Para comprobar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana, éstas fueron visualizadas mediante la tinción con Rojo Ponceau según el siguiente protocolo.

1.- Sumergir la membrana en la solución de Ponceau durante 5 min

Ponceau S	0,5 g
-----------	-------

Ácido acético glacial	1 ml
-----------------------	------

Agua destilada	hasta 100 ml
----------------	--------------

Hacer inmediatamente antes de usar.

2.- Desteñir ligeramente durante 2 minutos en agua destilada y analizarlo.

3.- Desteñir completamente la membrana lavando en agua destilada (aproximadamente 15 minutos) y continuar con la inmunodetección.

### 2.3.5.- INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Antes de realizar la inmunodetección de las proteínas se procede a bloquear la membrana mediante incubación en leche desnatada en polvo al 5% en TTBS (Tween Tris Buffered Saline) durante 1 h a T<sup>a</sup> ambiente.

#### Tris Buffered Saline (TBS)

Trizma base (Sigma T6066)	2,42 g
---------------------------	--------

NaCl	8 g
------	-----

Agua U.P.	hasta 1 litro
-----------	---------------

Ajustar el pH a 7,5 con HCl.

#### Tween Tris Buffered Saline (TTBS)

TBS	1 litro
-----	---------

Tween 20	1 ml
----------	------

Tras lavar las membranas con TTBS (2x5min), se añade el anticuerpo monoclonal anti-mGluR1a (BD Biosciences, Cat. 556389) generado en ratón, diluido 1:500 en TTBS con leche desnatada en polvo al 5% y se incuba durante toda la noche a 4°C. También se utilizó un anticuerpo anti-β-tubulina generado en conejo (Millipore, Cat. 04-1094) 1:200 que se utilizó para detectar la β-tubulina (pm 55 kDa) en nuestras



membranas y utilizarlo como control de carga.

A continuación se realizan varios lavados con TTBS (2x10min) y posteriormente se realizó la incubación en el anticuerpo secundario frente a IgG de ratón (1:5.000) o frente a la de conejo (1:10.000) conjugados con peroxidasa en TTBS con 5% de leche desnatada en polvo durante 1h 30min a T<sup>a</sup> ambiente. Tras la incubación se realizan lavados en TTBS (2x10min) y un lavado final con TBS (1x15min).

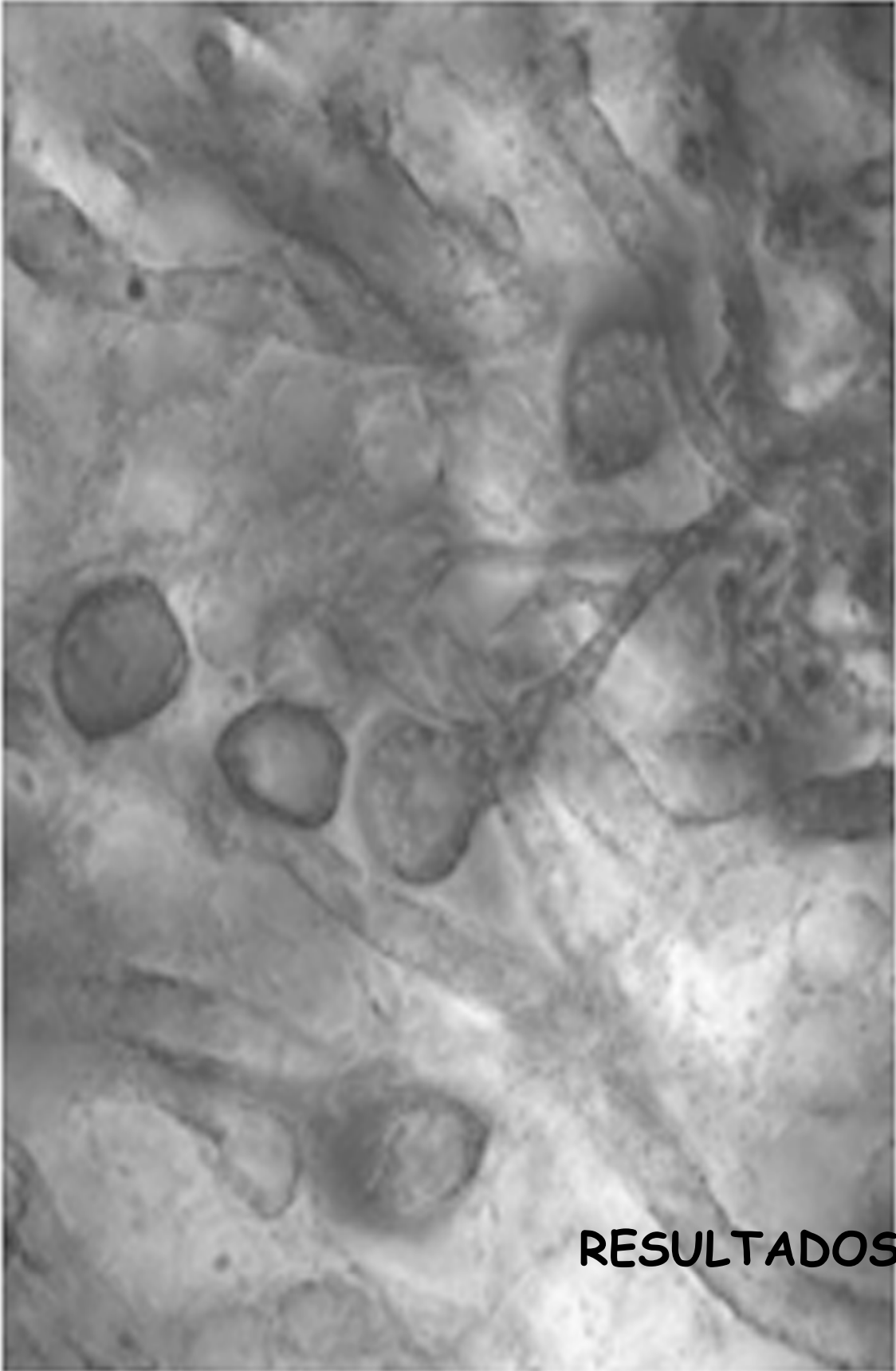
A continuación se preparan 2ml de reactivo Luminol (ECL Western Blotting Substrate, Pierce) por membrana, mezclando cantidades iguales de los reactivos A y B. Se añade inmediatamente sobre la membrana colocada sobre una hoja de poliéster, asegurándose de que queda cubierta toda la membrana. Se incuba 1min y se escurre el exceso de reactivo en un papel de filtro. En este paso tiene lugar la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por acción de la peroxidasa que, a su vez, produce la oxidación del luminol dando lugar a un compuesto que emite luz.

Entonces se introduce la membrana en un cassette de autoradiografía y se expone, aproximadamente 1 min, sobre una película (Kodak BioMax XAR Film, Cat. 165-1454) que detecta la señal quimioluminiscente. Una vez revelada y fijada la película, se obtienen las bandas correspondientes a las proteínas objeto de estudio, así como la de la  $\beta$ -tubulina que nos permite comprobar que la cantidad de proteína cargada en cada línea ha sido igual en todos los casos.

### 2.3.6.- DENSITOMETRÍA

Disponemos de 6 grupos de estudio: Electroforesis-Western Blotting realizados en condiciones desnaturalizantes de bulbos deprivados, contralaterales (control) y naïve, y en condiciones nativas de bulbos deprivados, contralaterales (control) y naïve. Los resultados obtenidos en todos los casos (8 réplicas para cada caso de estudio) presentaban un patrón idéntico de bandas y las únicas diferencias se correspondían a pequeñas variaciones en la saturación de la imagen que eran únicamente atribuibles a diferencias en el proceso de revelado de la película. Por otra parte, los resultados de bulbos contralaterales a la deprivación y los de los animales naïve, no mostraron ninguna diferencia entre sí.

Las películas se escanearon a una resolución de 600 ppi, generándose archivos en formato TIFF de cada caso. Estos archivos TIFF se exportaron y se abrieron con el programa Image J (NIH, USA). Con la herramienta adecuada se selecciona una zona rectangular de análisis lo más ajustada posible a la línea de carrera. Posteriormente se duplica esta zona de análisis (con las mismas dimensiones) y se aplica de igual modo al resto de líneas a analizar. A continuación se generan los perfiles de densidad de cada línea de carrera, obteniéndose una curva en la que los picos representan las zonas correspondientes a cada banda y en las que la altura del pico representa la intensidad de la misma. A continuación se delimitan los límites de cada pico mediante líneas rectas. Seleccionando el área delimitada bajo la curva de cada pico, el programa nos ofrece el porcentaje que representa, cada pico, respecto al área total de todas las bandas seleccionadas. En las ilustraciones correspondientes se muestra la línea de picos correspondiente a los patrones de bandas de todas las réplicas analizadas para cada uno de los casos, ofreciéndose un perfil-tipo de cada caso en el que se incluye el valor de la media ( $n=8$  en cada caso) del porcentaje de área del pico dentro del grupo  $\pm$  error estándar de la media.



**RESULTADOS**

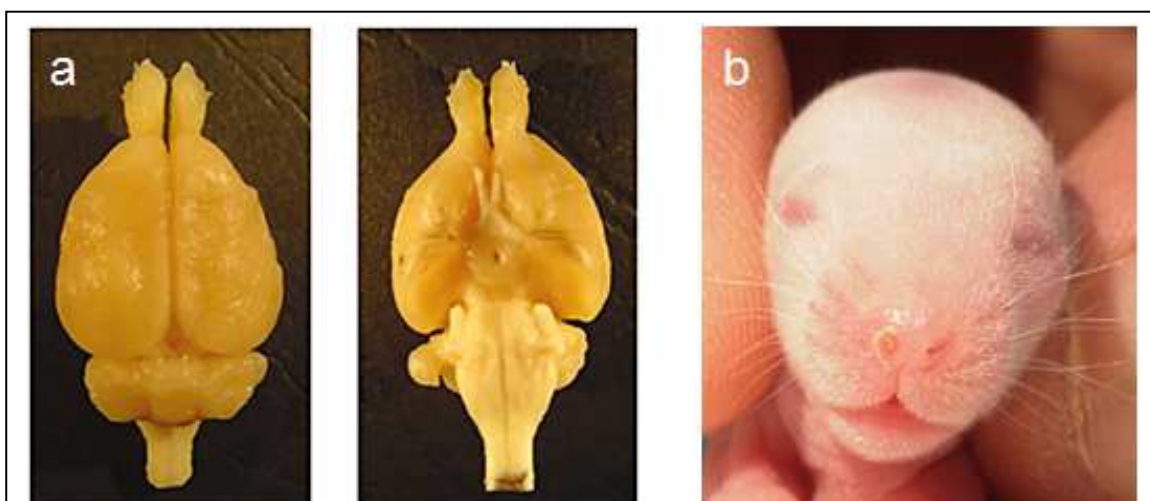
En la presente Tesis Doctoral hemos realizado un estudio detallado de la expresión del receptor mGlu1Ra, de su localización, distribución y características, en el bulbo olfatorio de la rata y de la caracterización de los elementos que lo expresan. Este patrón nos ha servido como referencia para analizar posteriormente cómo y en qué grado la expresión de este receptor es regulada cuando se elimina la estimulación olfatoria aferente, que es, por otra parte, fundamentalmente glutamatérgica. Para realizar este estudio hemos aplicado técnicas inmunohistoquímicas para la detección del receptor directamente sobre secciones de tejido, y una vez obtenida la localización *in situ* del receptor, realizamos un estudio proteómico para profundizar en la determinación del grado de afectación y las posibles modificaciones del receptor como consecuencia de la ausencia de estimulación olfatoria aferente.

## CONTROL DEL PROCEDIMIENTO DE DEPRIVACIÓN OLFATORIA

Como paso previo, para asegurarnos de que los animales del grupo experimental estuvieron sometidos a una completa privación olfatoria, con su narina derecha continuamente cerrada desde el día del procedimiento quirúrgico (P1) hasta el día del sacrificio (P60), debemos hacer una evaluación del procedimiento. Para ello realizamos diferentes controles de la privación.

La primera valoración consiste en un reconocimiento visual de la lesión bajo la lupa, que realizamos diariamente desde P1 hasta su completa cicatrización, que tenía lugar entre P12 y P20 (fig. 42). Posteriormente, aproximadamente a P25, las crías son destetadas y separadas de la madre.

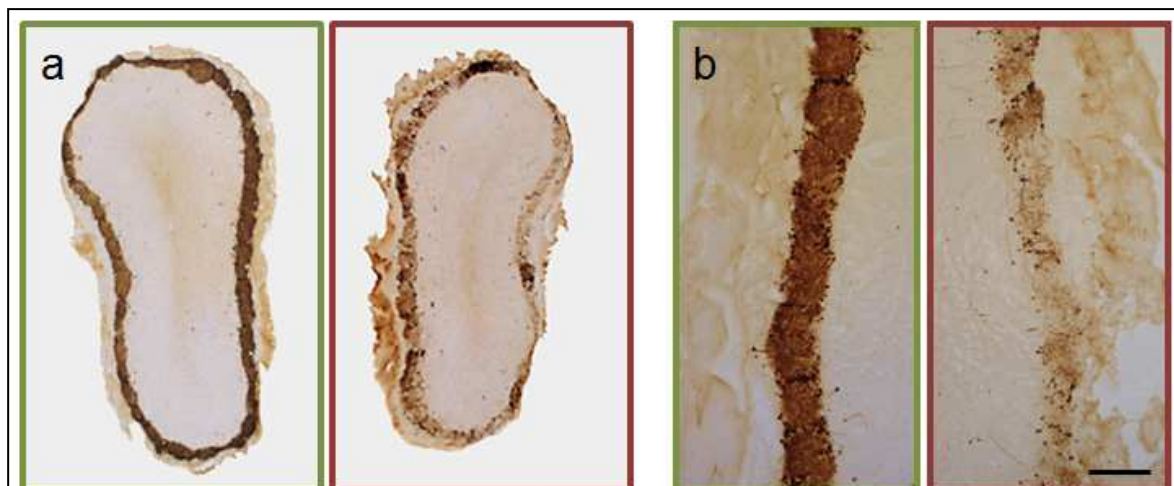
Un segundo control macroscópico consiste en la observación de los bulbos olfatorios tras la extracción del encéfalo una vez finalizada la fijación del animal por perfusión. En los animales privados, el bulbo ipsilateral a la narina ocluida muestra una evidente reducción de tamaño en comparación con el bulbo contralateral a la oclusión (fig. 42). Esta reducción es también evidente en la posterior observación de las secciones histológicas teñidas con la técnica de Nissl, que se manifiesta en la anchura de las capas bulbares, fundamentalmente en la CPE y la CCG tal como describe Brunjes (1994).



**Figura 42.**- Tras extraer el cerebro del cráneo podemos observar una reducción de tamaño del bulbo derecho sometido a la privación, en comparación con el bulbo contralateral a la oclusión. Esta diferencia se puede apreciar en la imagen (a) tanto en vista dorsal (izda) como ventral (dcha). En la imagen (b) mostramos una cría a P8 con la narina derecha completamente tapada.

Por último, realizamos un control inmunohistoquímico (fig. 43) en el que pusimos de manifiesto la expresión de tirosina hidroxilasa, el enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas, en el bulbo olfatorio. Como fue descrito en su momento (Baker y cols., 1983; 1988; 1993) la expresión de tirosina hidroxilasa en las células yuxtglomerulares del bulbo olfatorio está regulada por la actividad aferente. Ante la ausencia de estimulación olfatoria se produce un notable descenso de la expresión de este enzima en estos tipos neuronales, lo cual constituye un excelente marcador de la correcta deprivación sensorial (fig. 43).

Mediante todos estos "controles de procedimiento" hemos incluido en el estudio sólo aquellos animales que han estado sujetos a una correcta deprivación olfatoria unilateral durante todo el periodo experimental.



**Figura 43.-** La inmunorreactividad a tirosina hidroxilasa sufre una drástica reducción tras la deprivación olfatoria como se observa al comparar secciones panorámicas (a) de bulbo control (izda) frente a bulbo deprivado (dcha). Esta reducción se aprecia mejor a mayor aumento (b) en las secciones de bulbo control (izda) frente a bulbo deprivado (dcha). Barra de escala en (a)= 500  $\mu$ m, y en (b)= 150  $\mu$ m

Por otra parte, es necesario aclarar que, como se ha demostrado en anteriores estudios (Brunjes, 1994; Briñón y cols., 2001; Barbado y cols., 2001, 2002), realizando estos mismos procedimientos de deprivación olfatoria, los bulbos olfatorios contralaterales a la deprivación no muestran ningún signo de afectación que pudiera venir derivado de las alteraciones de su correspondiente bulbo deprivado. Dicho de otro modo, los bulbos contralaterales de animales deprivados son perfectamente

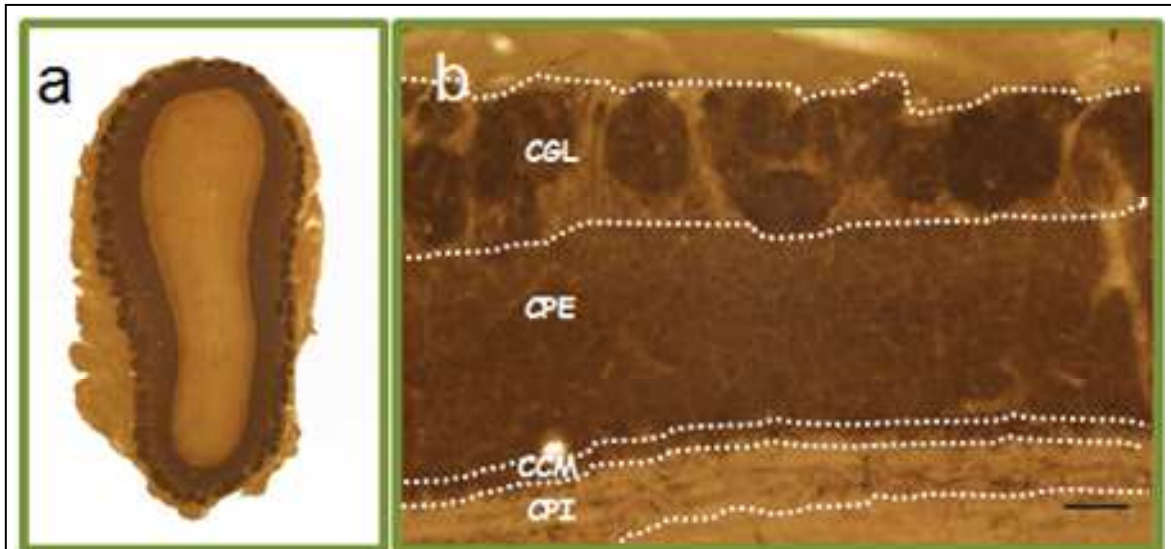
equiparables a los bulbos olfatorios de animales control (naïve), que no han sufrido ningún tipo de intervención. De hecho, en la presente Tesis Doctoral hemos podido corroborar este extremo, de modo que en la exposición de nuestros resultados haremos referencia a bulbos control sin diferenciar entre bulbos contralaterales de animales experimentales y bulbos olfatorios de animales control (naïve).

## **CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA EXPRESIÓN DEL mGluR1 $\alpha$ EN EL BULBO OLFATORIO**

### **ESTUDIO DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL mGluR1 $\alpha$ . LOCALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN**

Existen algunos estudios previos que describen la distribución de los elementos que expresan mGluR1 $\alpha$  en el cerebro de rata (Martin y cols., 1992; Shigemoto y cols., 1992; Van den Pol, 1995; Ferraguti y cols., 1998; Luján y Ciruela, 2001; Lavreysen y cols., 2004). Estas descripciones, probablemente debido a la extensión del análisis, incluyen grandes regiones encefálicas, por lo que son poco detalladas en lo que respecta al bulbo olfatorio. Aunque apuntan a que el bulbo olfatorio es una de las regiones con mayor expresión de este receptor, apenas hacen más referencias al patrón de expresión que en lo referente a las distintas capas, obviando la identificación de las diferentes poblaciones neuronales que lo expresan. Por ello, como paso previo al estudio de las posibles modificaciones de su expresión en condiciones experimentales, hemos realizado un mapeo detallado de la expresión del mGluR1 $\alpha$  en el bulbo olfatorio en condiciones control.

La inmunorreactividad para el mGluR1 $\alpha$  en el bulbo olfatorio mostró un claro patrón de expresión laminado (fig. 44). En vistas panorámicas, como se puede observar en la figura 44, el inmunomarcaje aparece principalmente en la CGL, la CPE, la CCM y en menor medida en la CPI, mientras que la CNO y la CCG carecen de expresión del mGluR1 $\alpha$ .



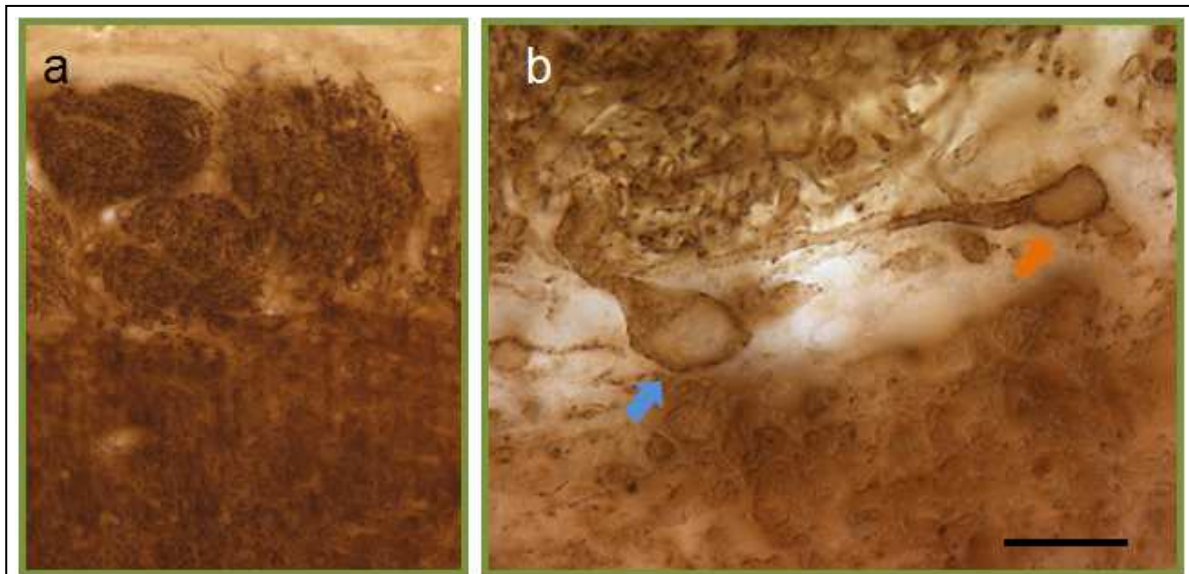
**Figura 44.-** Patrón de expresión de mGluR1a en el bulbo olfatorio de una rata control. El marcaje, como se aprecia en (a), se distribuye por casi todas las capas bulbares, excepto en la más externa (CNO) y la más interna (CCG). En la imagen (b), a más aumento, podemos observar la distribución laminar del inmunomarcaje para el mGluR1a, siendo la CGL la de mayor intensidad y la CPI la de menor densidad de elementos inmunopositivos. Barra de escala en (a)= 500  $\mu$ m, y en (b)= 75  $\mu$ m.

El marcaje para este receptor es intenso, y extenso en todas las capas inmunomarcadas, excepto en la CPI, donde no abarca toda su extensión, sino que queda restringido a grupos de neuronas y fibras que, en conjunto, parecen describir un anillo concéntrico en la zona más profunda de la capa.

La expresión del mGluR1a es poco selectiva en cuanto al tipo de neuronas, encontrándose tanto en neuronas principales como en interneuronas. Respecto a su localización subcelular, el inmunoprecipitado no queda restringido a la membrana plasmática, sino que también se detecta en el interior citoplásmico, donde presenta una distribución tanto somática como dendrítica.

**Patrón de expresión en la Capa Glomerular:** La CGL es la capa que presenta un marcaje más llamativo por su intensidad. Los glomérulos aparecen invadidos por una gran cantidad de neuropilo mGluR1a-positivo (fig. 45). Parte de este marcaje se corresponde con las ramificaciones dendríticas de cM/Es que alcanzan los glomérulos, pero también con los árboles dendríticos de células yuxtglomerulares.

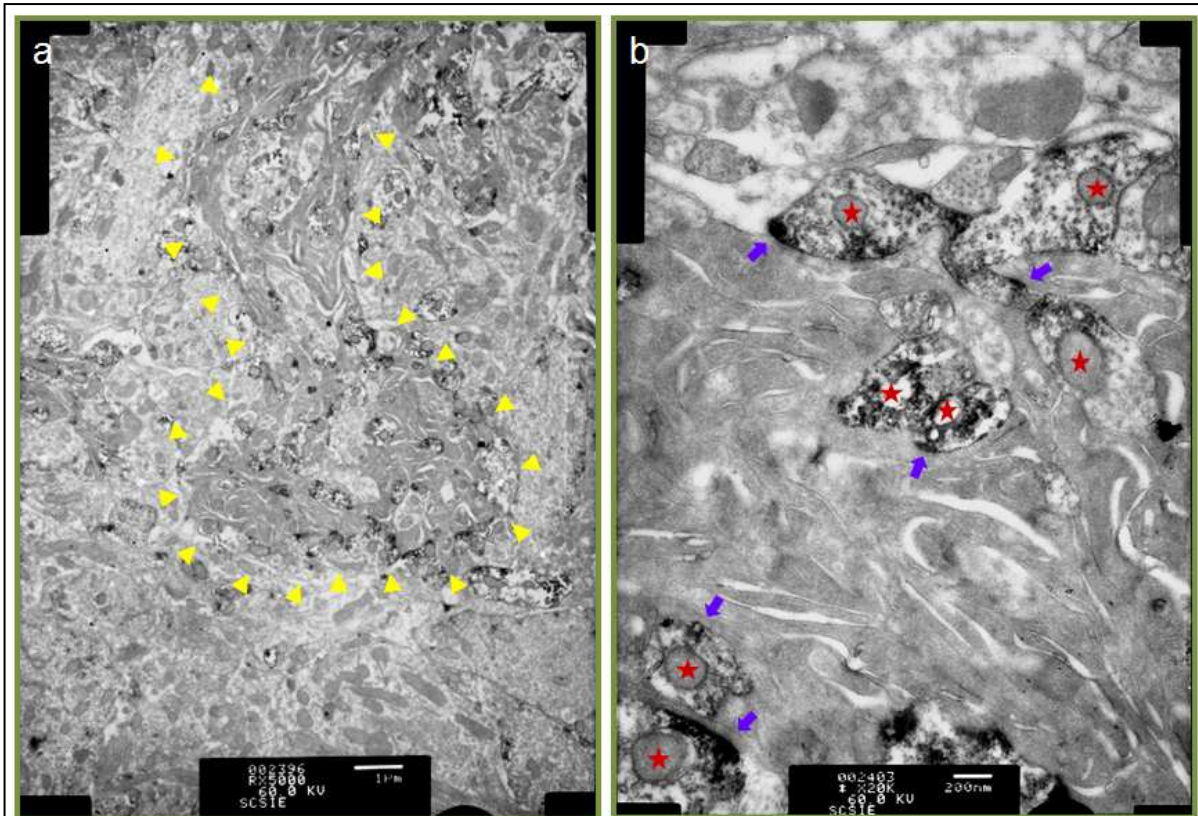




**Figura 45.-** Secciones coronales realizadas con vibratomo e inmunomarcadas para mGluR1a. En (a) puede observarse el denso marcaje tanto en la CGL, donde aparecen marcados intensamente el neuropilo glomerular y los somas de algunas neuronas yuxtaglomerulares, como en la CPE. A mayor aumento (b) observamos los somas de dos neuronas yuxtaglomerulares, situadas en el límite entre la CGL y la CPE, con sus dendritas adentrándose en el interior glomerular. Las características morfológicas de las mismas se corresponden con una célula empenachada externa (flecha azul) y con una célula periglomerular (flecha naranja). Barra de escala en (a)= 50  $\mu$ m, y en (b)= 10  $\mu$ m.

De hecho, una observación más detallada y a altos aumentos permite visualizar la entrada al glomérulo de dendritas de neuronas yuxtaglomerulares que corresponden a diferentes tipos, en la figura 45b se muestran una cEE y una cPG

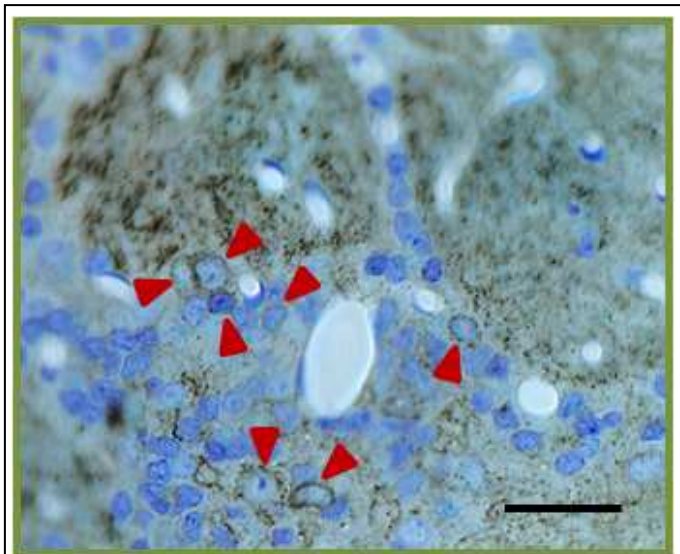
A pesar de que los axones del nervio olfatorio carecen de marcaje, y que el examen a microscopía óptica no revela terminales axónicos inmunopositivos, no podemos descartar que los extremos distales de los componentes axónicos en el interior del glomérulo también contribuyan al intenso marcaje que manifiesta el neuropilo. Además, nos planteamos el examen pormenorizado de los elementos positivos a mGluR1a dentro de la gran cantidad de elementos constituyentes del neuropilo en esta región. Por ello realizamos un estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (fig. 46), que nos permitiera realizar una descripción más detallada de los elementos positivos a mGluR1a en la zona glomerular.



**Figura 46.** - Imágenes de microscopía electrónica de transmisión del interior de un glomérulo. En (a) puede apreciarse, en el centro de la imagen, una zona más electrodensa (delimitada por puntas de flecha amarillas) perteneciente a los axones de las NROs. Nótese como la mayor parte de los perfiles positivos a mGluR1a están en relación con éstos, mientras que en el compartimento dendrítico (resto de la imagen) son escasos. En (b), detalle en el que se aprecia la relación entre los axones de las NROs, totalmente inmunonegativos, y los elementos positivos a mGluR1a. Los asteriscos rojos señalan elementos inmunopositivos para mGluR1a, y las flechas azules indican sinapsis asimétricas desde los axones de las NROs sobre los elementos positivos a mGluR1a.

Como podemos comprobar en las imágenes de microscopía electrónica (fig. 46), los perfiles mGluR1a-positivos son exclusivamente dendríticos. Los axones procedentes de las NRO, que se aprecian en las imágenes como regiones más electrodensas, en ningún caso aparecen inmunomarcados, siendo claramente negativos. Además, las dendritas inmunomarcadas, que corresponden tanto a dendritas de interneuronas yuxtglomerulares como a las de neuronas de proyección, cM/Es pueden observarse en estrecha relación con las regiones ocupadas por los axones de las NROs, siendo escasas en zonas alejadas de los mismos. Es decir, los perfiles dendríticos inmunopositivos aparecen mayoritariamente en el compartimento axonal

(zona-NO), mientras que son notablemente más escasos en el compartimento dendrítico (zona no-NO) (fig. 46).



**Figura 47.** - Fotomicrografía de una sección semifina con el marcaje para mGluR1a realizado en pre-inclusión y contrateñido con azul de toluidina. Las células yuxtglomerulares marcadas (puntas de flecha) muestran el precipitado en el citoplasma, quedando el núcleo libre del mismo. Barra de escala =30  $\mu$ m.

Rodeando los glomérulos encontramos numerosos somas de las células yuxtglomerulares mGluR1a-inmunopositivas, y cuyas dendritas contribuyen al marcaje del neuropilo glomerular. El inmunomarcaje celular se distribuye principalmente por el citoplasma mientras que el núcleo es claramente negativo al mGluR1a (fig. 47).

Es también de destacar el marcaje punteado que se observa en el interior de los glomérulos y

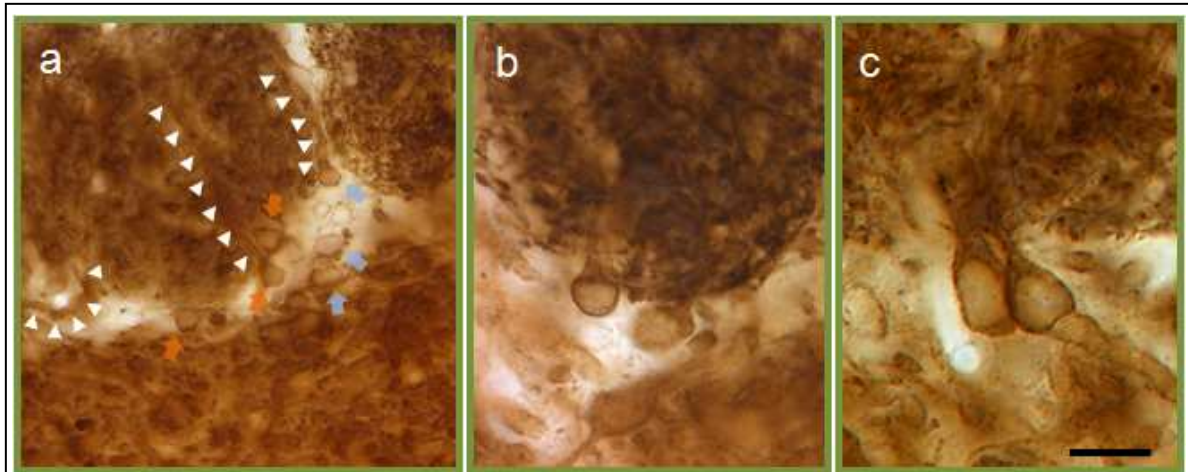
que se corresponde con dendritas de neuronas inmunopositivas que se arborizan profusamente en su interior (fig. 47).

Entre las células yuxtglomerulares positivas se pueden diferenciar morfológicamente, al menos, dos tipos. Un grupo de células con soma ovoide o piriforme y con un tamaño medio de aproximadamente 10-15  $\mu$ m de diámetro, con el tronco dendrítico principal grueso y liso, que son las características morfológicas típicas descritas para las cEEs (fig. 48a, c).

Acompañando a éstas, alrededor del glomérulo, observamos otro grupo de neuronas que presentan somas de menor tamaño (6-8  $\mu$ m) y con morfología esférica y/o ligeramente piriforme, y con la dendrita principal fina y de recorrido tortuoso en su camino hacia el glomérulo y que se corresponderían con cPGs (fig. 48a, b).

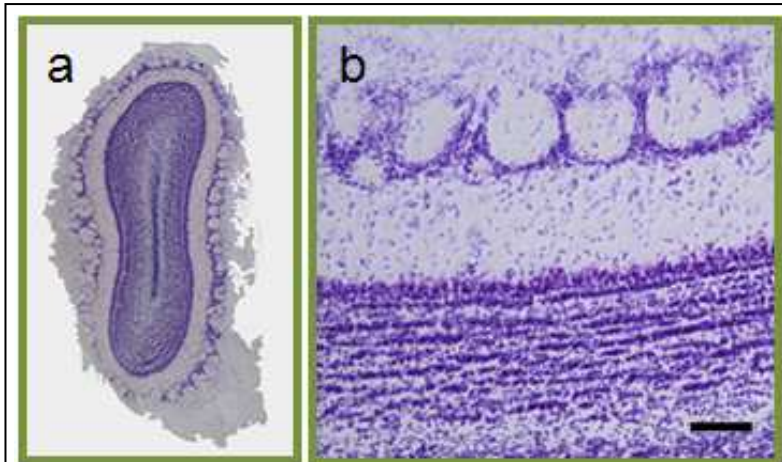
Con frecuencia las dendritas de las células yuxtglomerulares, y en ocasiones las dendritas de las neuronas de proyección, presentan una densidad de marcaje que

permite seguir su trayectoria desde su salida del soma hasta que se adentran en el glomérulo (fig. 48).



**Figura 48.** - En la CGL aparecen diferentes tipos de células yuxtglomerulares inmunomarcadas (a), con el soma más cercano al contorno glomerular las células identificadas como células periglomerulares (flechas naranja), y justo por debajo de los glomérulos, y entre éstos, se aprecian somas de mayor tamaño y con una morfología ovoide que proyectan dendritas de mayor calibre que las anteriores, y que pertenecen a células empenachadas externas (flechas azules). Nótese el recorrido de procesos dendríticos que se adentran en el glomérulo, marcados con puntas de flecha blancas. Detalle de neuronas yuxtglomerulares mGluR1a-positivas, células periglomerulares (b) y células empenachadas externas (c). Barra de escala en (a)= 25  $\mu\text{m}$ , y en (b) y (c)= 10  $\mu\text{m}$ .

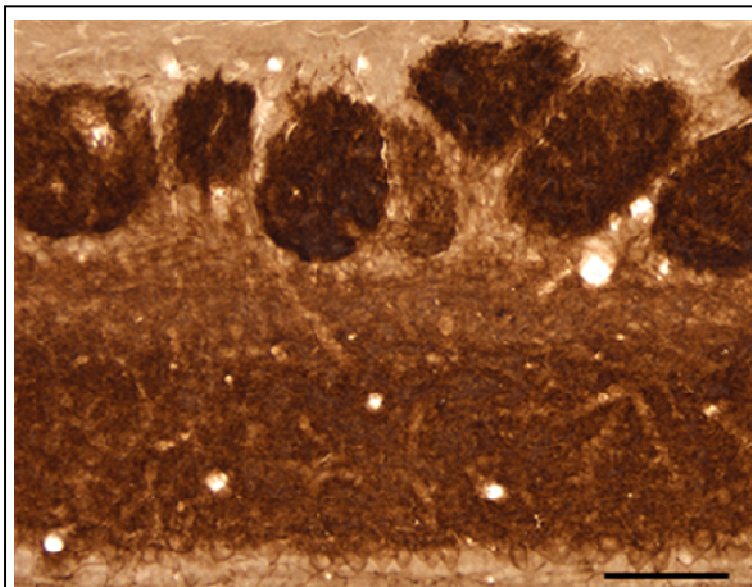
La intensidad del inmunomarcaje del neuropilo, junto con la abundancia de somas y de procesos dendríticos mGluR1a-positivos que confluyen en la capa glomerular, dificultan, en la mayoría de las ocasiones, un análisis óptimo, ya que algunos elementos enmascaran o se superponen a otros. No obstante, parecía bastante evidente que el número de células yuxtglomerulares positivas a mGluR1a no se corresponde con la población total de estas células. Para determinar, al menos de forma aproximada, el porcentaje de células yuxtglomerulares positivas al receptor respecto del total de la población, realizamos recuentos celulares en 15 glomérulos seleccionados al azar de secciones inmunomarcadas para mGluR1a. Este número lo referimos al total de células por glomérulo, que determinamos mediante el recuento de otros 15 glomérulos elegidos aleatoriamente en secciones equivalentes teñidas con la técnica de Nissl (fig. 49).



**Figura 49.-** Tinción se Nissl sobre sección de vibratomo. En (a) panorámica del bulbo. En (b), a más aumento, apreciamos la distribución celular por capas y permite individualizar los somas celulares para realizar el recuento celular. Barra de escala en (a)= 500  $\mu\text{m}$ , y en (b)= 100  $\mu\text{m}$ .

La confrontación de secciones equivalentes marcadas para el mGluR1a con secciones teñidas con Nissl, mostró que las células yuxtglomerulares positivas a mGluR1a no representan el total de la población sino el 15%, aproximadamente, de las mismas.

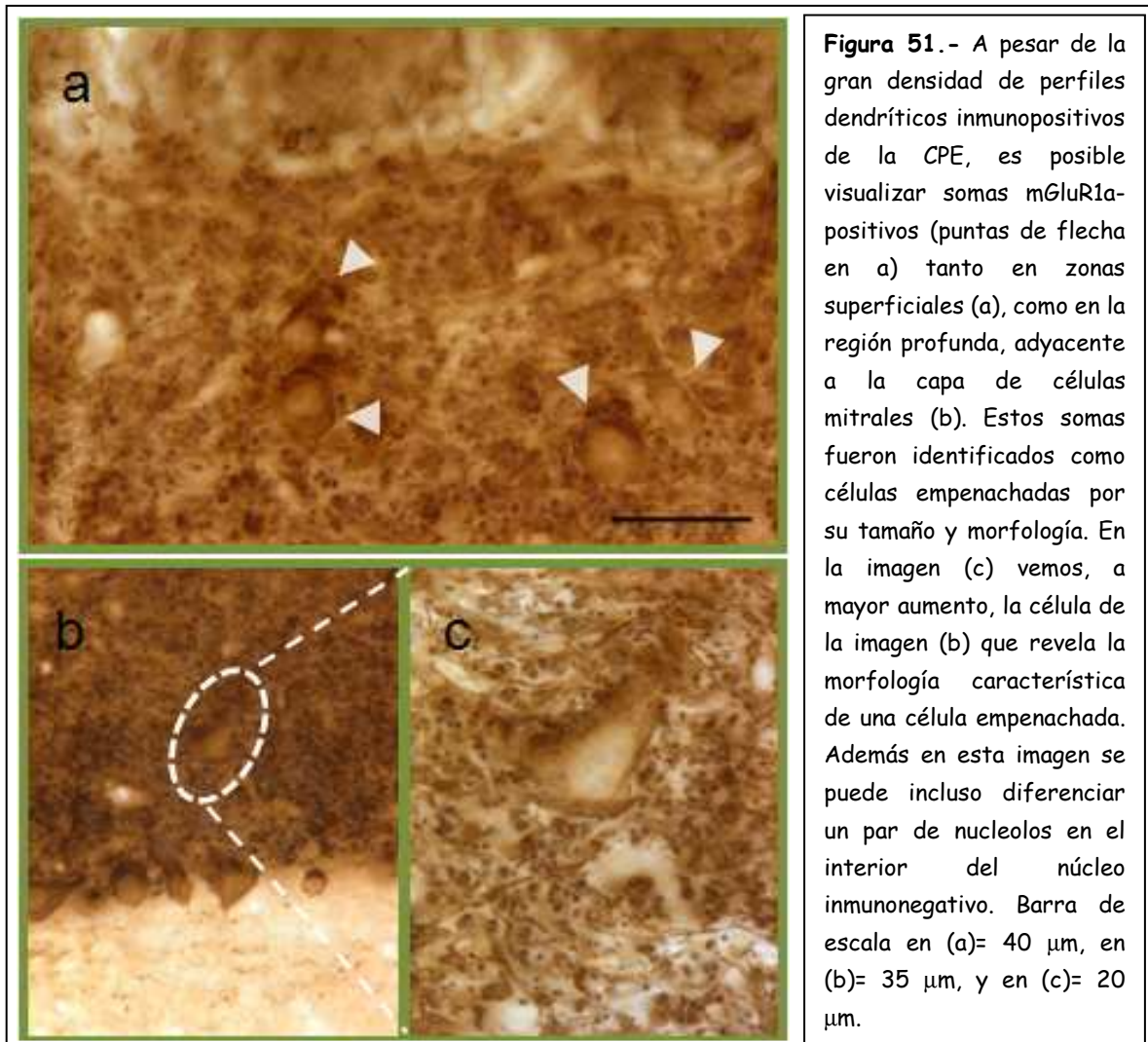
**Patrón de expresión en la Capa Plexiforme Externa:** En la CPE encontramos un marcaje muy denso que se extiende por toda la capa (fig 50), y que se corresponde mayoritariamente con las prolongaciones dendríticas de cM/Es. No



**Figura 50.-** Marcaje para mGluR1a en la CPE, enmarcada entre la CGL en la parte superficial y la delgada CCM en la parte inferior. Nótese la menor densidad de marcaje en el tercio superficial de la CPE. Barra de escala = 150  $\mu\text{m}$

obstante, este marcaje no es uniforme, de modo que se pueden distinguir dos zonas en función de su intensidad. El tercio más superficial de la CPE presenta un marcaje menos intenso (donde se distribuyen los somas de las cES y cEM) que los dos tercios más profundos, que corresponde a las zonas medial y profunda de la capa, donde se encuentran las cEP (fig. 50).

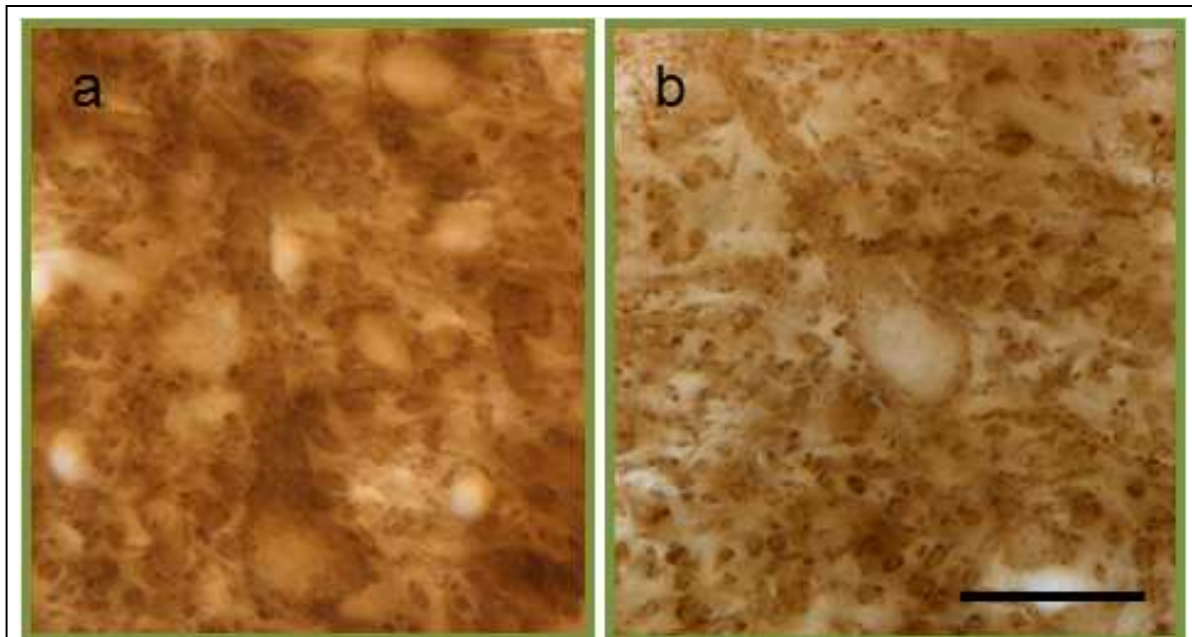
La intensidad del marcaje del neuropilo en la CPE dificulta la observación individual del resto de elementos positivos al mGluR1a. A pesar de ello, una observación minuciosa a mayores aumentos de las secciones de vibratomo, junto con el estudio de secciones semifinas, nos permitió distinguir entre el abundante neuropilo algunos somas neuronales mGluR1a-positivos dispersos por la capa, aunque son más abundantes por la zona superficial de la CPE (fig. 51).



Todos los somas marcados para mGluR1a en la CPE son semejantes en cuanto a tamaño y características morfológicas del soma, y las hemos identificado como células empenachadas. Además, no observamos, en ningún caso, otros cuerpos celulares con características diferentes, por lo que asumimos que el único tipo neuronal mGluR1a-positivo de la CPE corresponde a células empenachadas, mientras que la población de interneuronas de esta capa carece de expresión del mGluR1a.

El recuento celular, realizado del mismo modo que el que se hizo para las células yuxtglomerulares, tomando como referencia las secciones teñidas con Nissl, reveló que una moderada población de células empenachadas expresan el mGluR1a.

En secciones favorables, y cuando la intensidad del marcaje lo permitió, pudimos observar la porción proximal del tronco dendrítico apical emergiendo del soma de estas neuronas y orientándose hacia regiones superficiales (fig. 52).

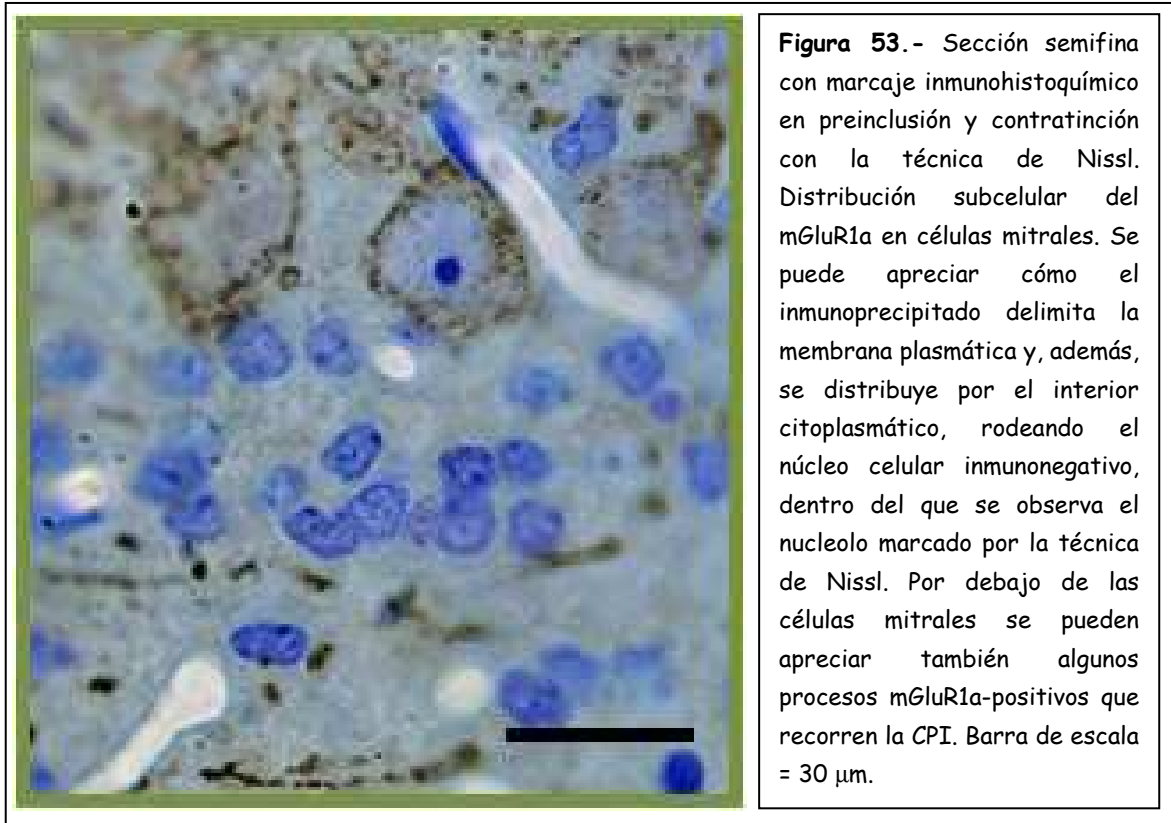


**Figura 52.-** Dos ejemplos de células empenachadas de la CPE positivas para mGluR1a en las que se puede observar la porción proximal de su gruesa dendrita principal que arranca del soma, proyectando hacia zonas más superficiales. Es de destacar la abundancia de perfiles dendríticos positivos que conforman el neuropilo que las rodea. Barra de escala = 25  $\mu$ m.

**Patrón de expresión en la Capa de las Células Mitrals:** La CCM muestra un marcaje similar al que aparece cuando se realiza la tinción histológica de Nissl, ya que todas las células mitrales expresan el mGluR1a, lo que permite observar claramente la capa de somas densamente empaquetados dispuesta como una hilera monocelular formando una capa continua con una orientación paralela a la laminación bulbar.

En secciones semifinas contrateñidas con la técnica de Nissl, el inmunoprecipitado en las células mitrales revela un núcleo, claramente negativo, mientras que el citoplasma muestra un marcaje punteado muy intenso y definido,

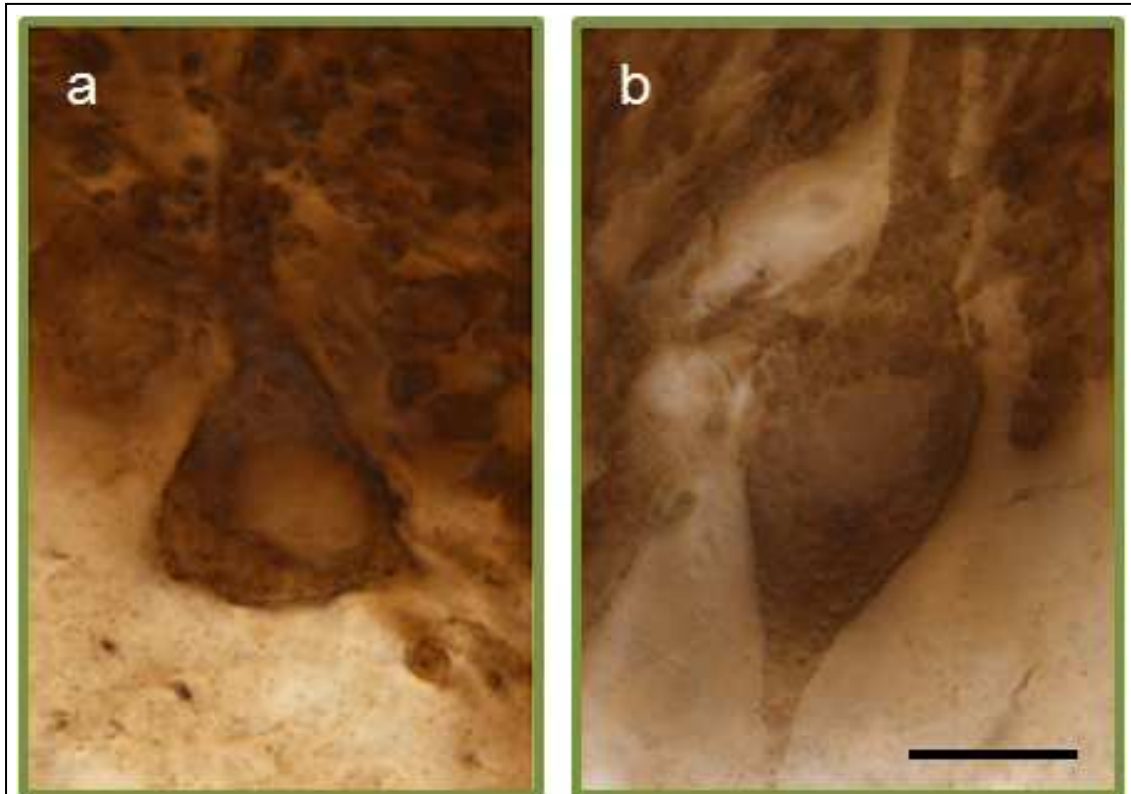
dispuesto característicamente en la zona superficial, en la membrana plasmática, aunque también, de modo menos denso, disperso por el citoplasma, presumiblemente asociado al retículo endoplasmático (fig. 53).



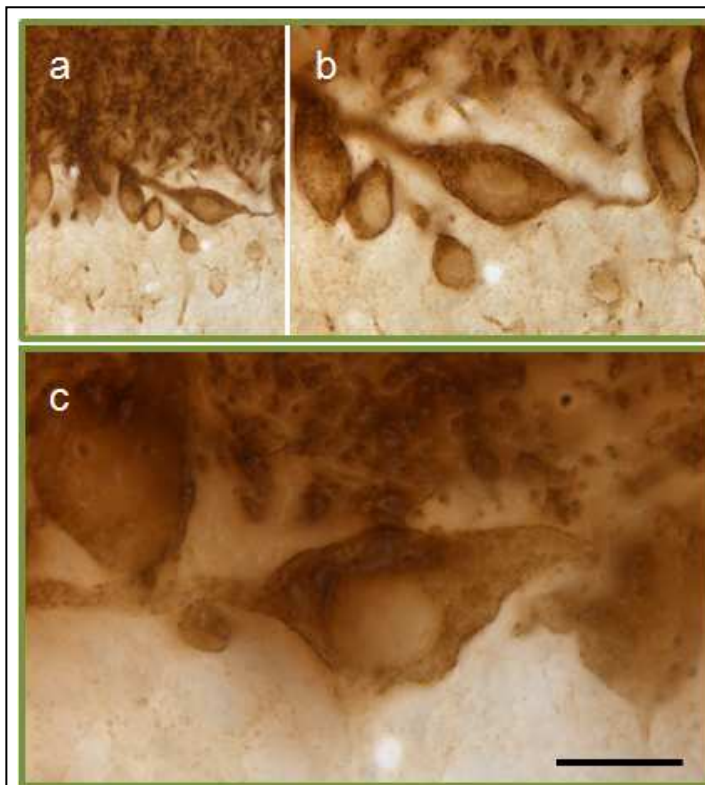
De forma similar a lo que ocurre en las células empenachadas, es habitual ver que el inmunomarcaje citoplasmático de las células mitrales se extiende por las porciones proximales de las dendritas, tanto apicales (fig. 54), como laterales (fig. 55), contribuyendo, junto con las dendritas inmunomarcadas de las células empenachadas, a la alta densidad de marcaje del neuropilo de la CPE. De hecho, en secciones favorables podemos observar estas porciones dendríticas proximales, tanto de dendritas apicales adentrándose en la CPE, como de dendritas laterales o secundarias que, surgiendo de polos opuestos del soma, siguen una orientación más o menos tangencial a la capa (fig. 55).

Debido al gran calibre de estas dendritas son fácilmente observables, junto con las dendritas de células empenachadas, en el límite CGL-CPE, penetrando hacia los glomérulos, como hemos visto en imágenes anteriores. (ver fig. 48a).



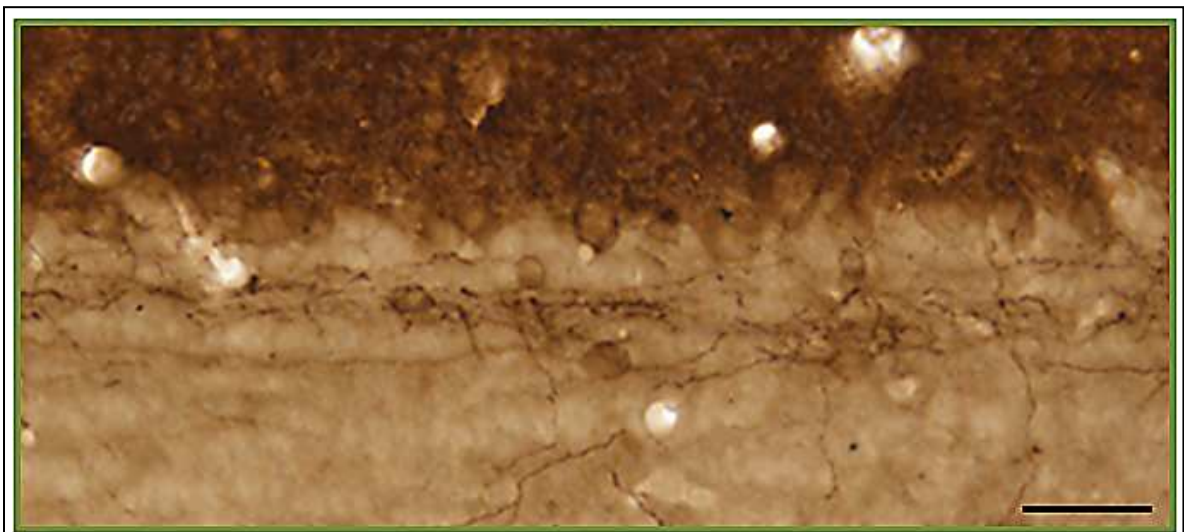


**Figura 54.** - Fotomicrografías de células mitrales capturadas a gran aumento. En la imagen (a) se muestra la morfología característica de una célula mitral (forma de mitra de obispo) con la porción proximal del tronco dendrítico inmunopositivo. En la imagen (b) incluso se hace evidente el cono axónico en la parte basal de su soma. Barra de escala = 15  $\mu$ m



**Figura 55.** - Todas las imágenes, (a), (b) y (c), corresponden a células mitrales inmunopositivas al mGluR1a. El marcaje nos permite observar las porciones proximales de sus dendritas secundarias, también inmunopositivas, extendiéndose paralelas a la capa. La imagen (b) corresponde a un aumento de la imagen (a). Nótese, en la imagen (c), la fina línea de mayor densidad de marcaje a lo largo de la membrana plasmática de la célula, que describe el contorno la misma. Barra de escala en (a)= 50  $\mu$ m, en (b)= 25  $\mu$ m, y en (c)= 15  $\mu$ m.

**Patrón de expresión en las Capas Inframitrales:** En las capas inframitrales desaparece bruscamente el intenso marcaje detectado en las capas más superficiales, con la única excepción de un moderado número de neuronas localizadas en la CPI, cerca del límite con la CCG. Estas células mGluR1a-positivas se disponen formando prácticamente una monocapa con sus dendritas arborizándose en esta misma capa en orientación horizontal (fig. 56).



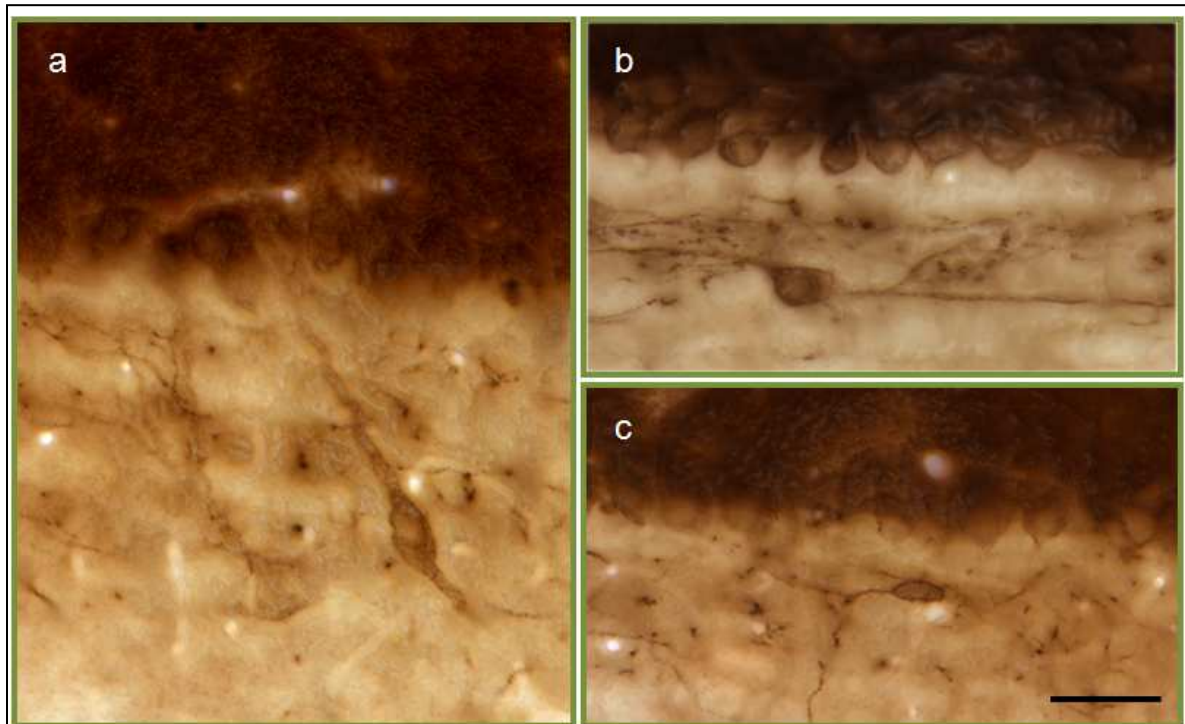
**Figura 56.** - Los elementos mGluR1a-positivos de la CPI definen un estrecho anillo de somas y fibras que recorren la capa inmediatamente por debajo de la CCM.

Barra de escala = 30  $\mu$ m

Estos somas, que aparecen marcados en la zona más profunda de la CPI, muestran una morfología más o menos ovoide y un tamaño medio de 12-18  $\mu$ m. En algunos casos los pocos datos morfológicos que revelan hace difícil su identificación, pero en otros casos la expresión de mGluR1a se prolonga por sus procesos dendríticos que surgen de polos opuestos del soma, extendiéndose con una orientación paralela a la laminación del bulbo. Por su localización y características dendríticas las hemos identificado como células horizontales (fig. 57 b, c). En menor medida, aparecen marcados algunos somas de morfología similar pero con sus dendritas principales orientadas de forma tangencial o perpendicular a la laminación, y que por sus características se corresponden con células verticales de Cajal (fig. 57a). En la misma

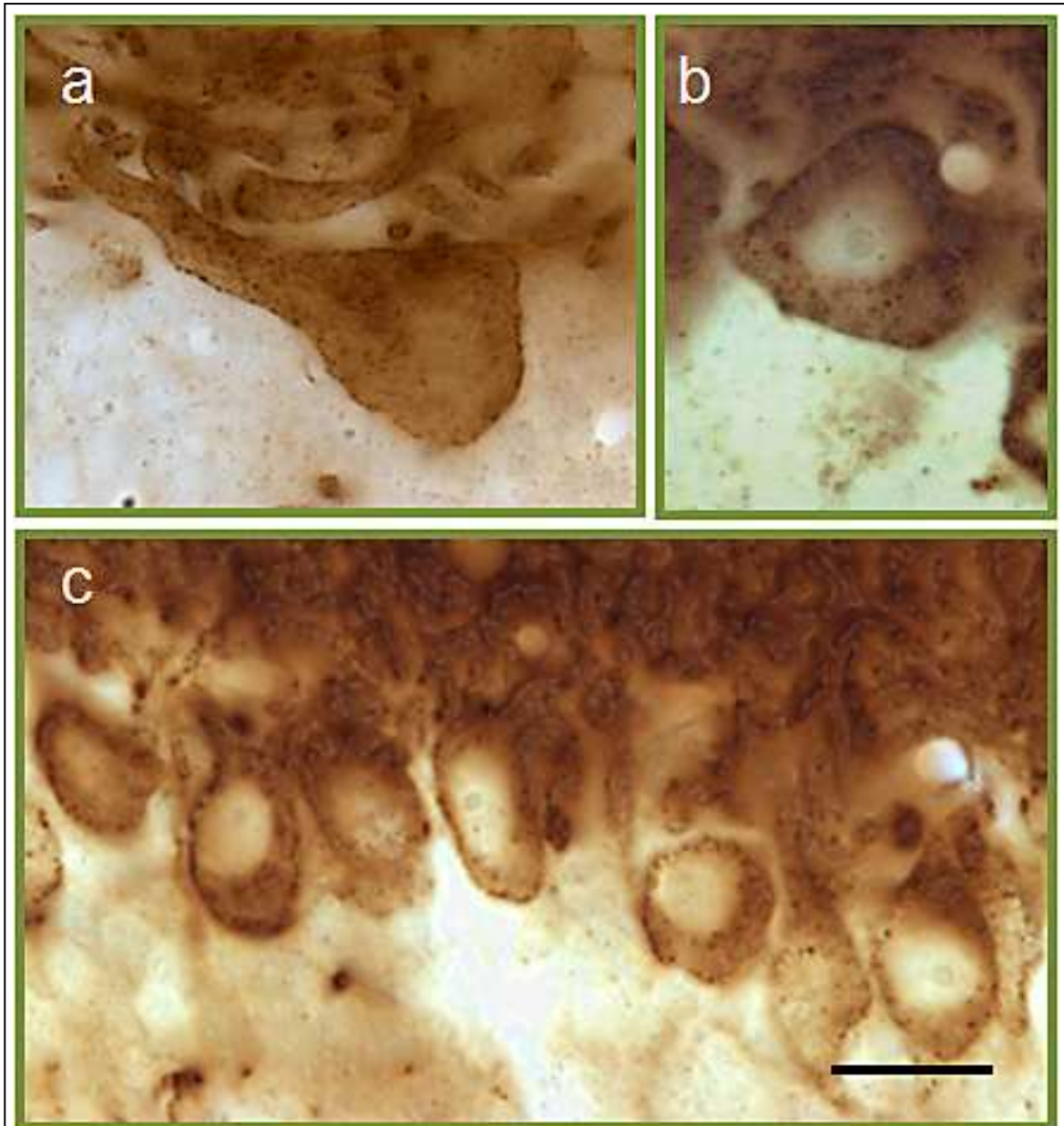
región, y entremezcladas con estas neuronas, podemos observar algunas fibras mGluR1a-positivas que muestran abundantes varicosidades.

En cuanto a las características del marcaje, éste es similar al que hemos referido para otros tipos celulares positivos, fundamentalmente citoplasmático, distribuido tanto en el soma como en dendritas, mientras que el núcleo aparece siempre negativo.



**Figura 57.**- Células inmunopositivas en la región profunda de la CPI. La imagen (a) muestra una célula vertical de Cajal, con el soma y las dendritas orientadas tangencialmente a la capa. En las imágenes (b) y (c) se observan células horizontales, con el soma y las dendritas dispuestas en paralelo a la laminación bulbar. Barra de escala en (a)= 35  $\mu\text{m}$ , en (b) y (c)= 50  $\mu\text{m}$ .

**Características del inmunomarcaje del mGluR1a:** El precipitado derivado del inmunomarcaje presenta una localización citoplásmica, quedando ausente del núcleo celular. Es característica su apariencia granular, con agrupaciones más densas que son observables a grandes aumentos, y que se sitúan muy frecuentemente en la superficie celular, en la membrana plasmática, tanto a nivel somático como dendrítico (fig. 58).

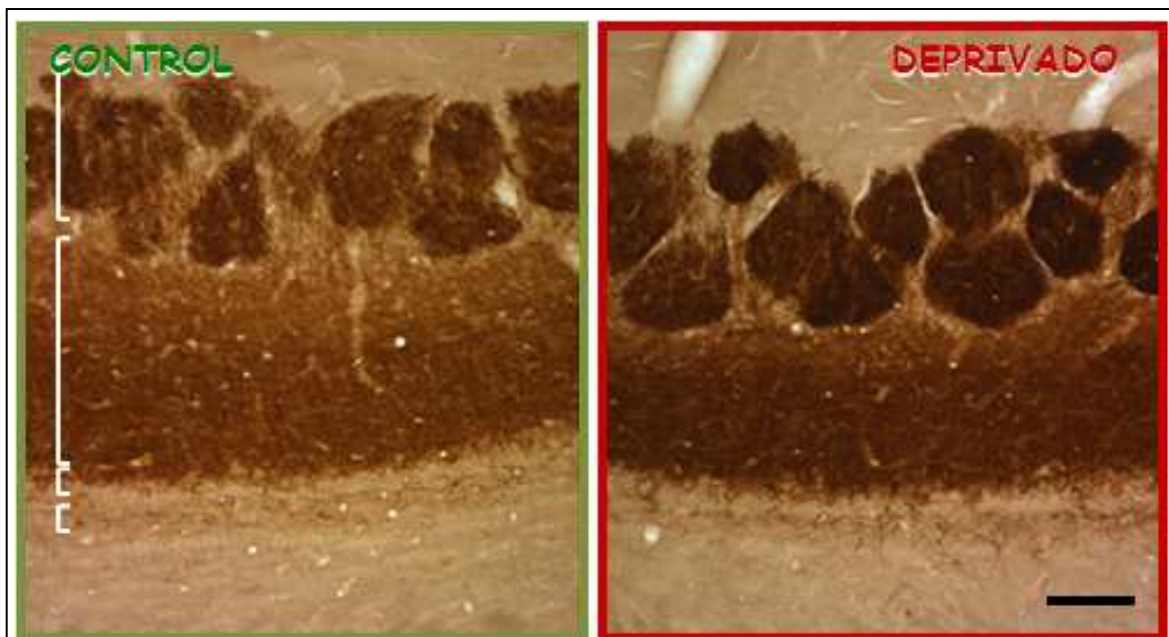


**Figura 58.** - Características del marcaje celular del mGluR1a. El inmunoprecipitado es muy definido en la membrana plasmática, lo que permite delimitar con bastante claridad los somas. La distribución del mGluR1a es citosólica, mientras que el núcleo se muestra negativo a la inmunorreactividad. Se puede apreciar en todas las imágenes el característico inmunoprecipitado granular. Barra de escala en (a) y (b)= 20  $\mu\text{m}$ , y en (c)= 25  $\mu\text{m}$ .

## MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN DE mGluR1a EN EL BULBO OLFATORIO EN AUSENCIA DE ESTIMULACIÓN AFERENTE

Antes de describir los efectos que produce la ausencia de estimulación olfatoria en la expresión del mGluR1a, debemos recordar que, tras la deprivación olfatoria el bulbo manifiesta una serie de alteraciones neurohistológicas y neuroquímicas importantes.

De modo general, podemos afirmar que el proceso de deprivación sensorial olfatoria conduce a un significativo incremento de la expresión del mGluR1a en el bulbo ipsilateral a la oclusión que se hace evidente al establecer la comparación tanto con el bulbo contralateral a la oclusión, como con los de animales naïve. Es importante recordar igualmente, que, como se apuntó al principio de esta sección, no se detectaron diferencias entre los bulbos contralaterales de animales experimentales respecto a los bulbos de animales control (naïve).

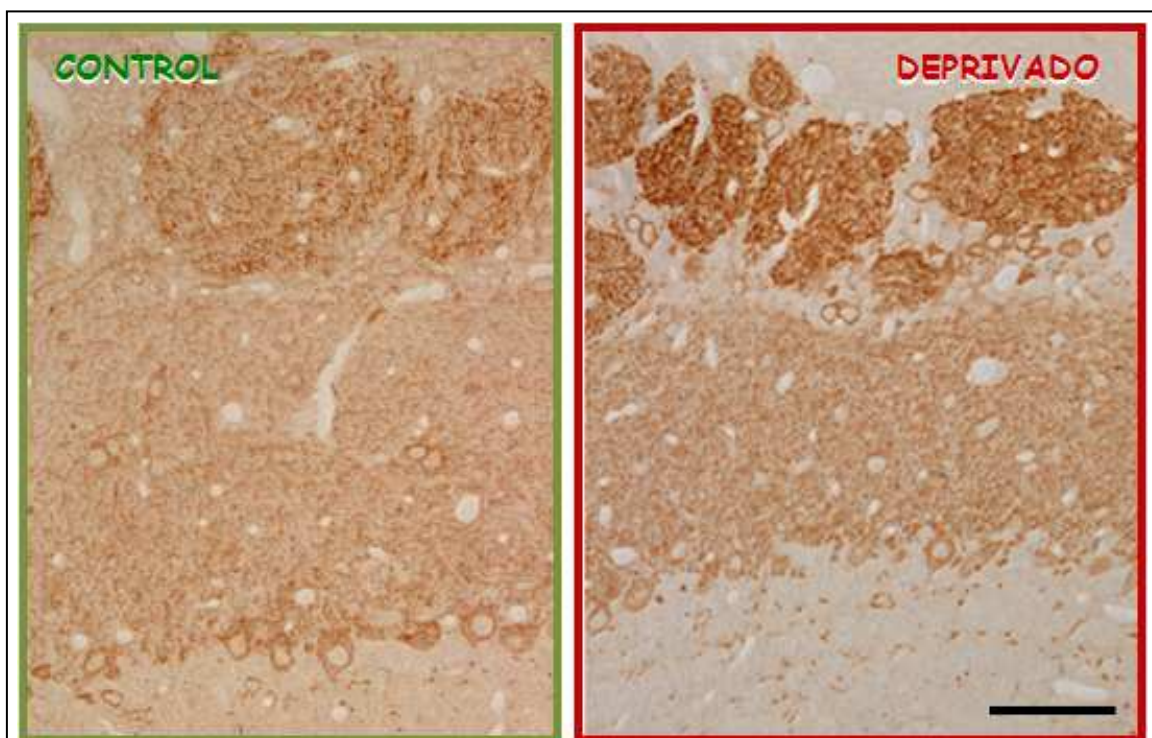


**Figura 59.** - Tras la pérdida de estimulación olfatoria se produce un destacado aumento de expresión del mGluR1a, muy llamativo en la CGL y en la CPE. Esta última capa, además muestra una notable reducción de volumen en el bulbo deprivado (dcha) cuando la comparamos con el bulbo control (izda). Barra de escala = 100  $\mu$ m.

El aumento de expresión del mGluR1a en el bulbo ipsilateral es bastante extenso y generalizado, siendo evidente tanto en las regiones más rostrales del bulbo como en

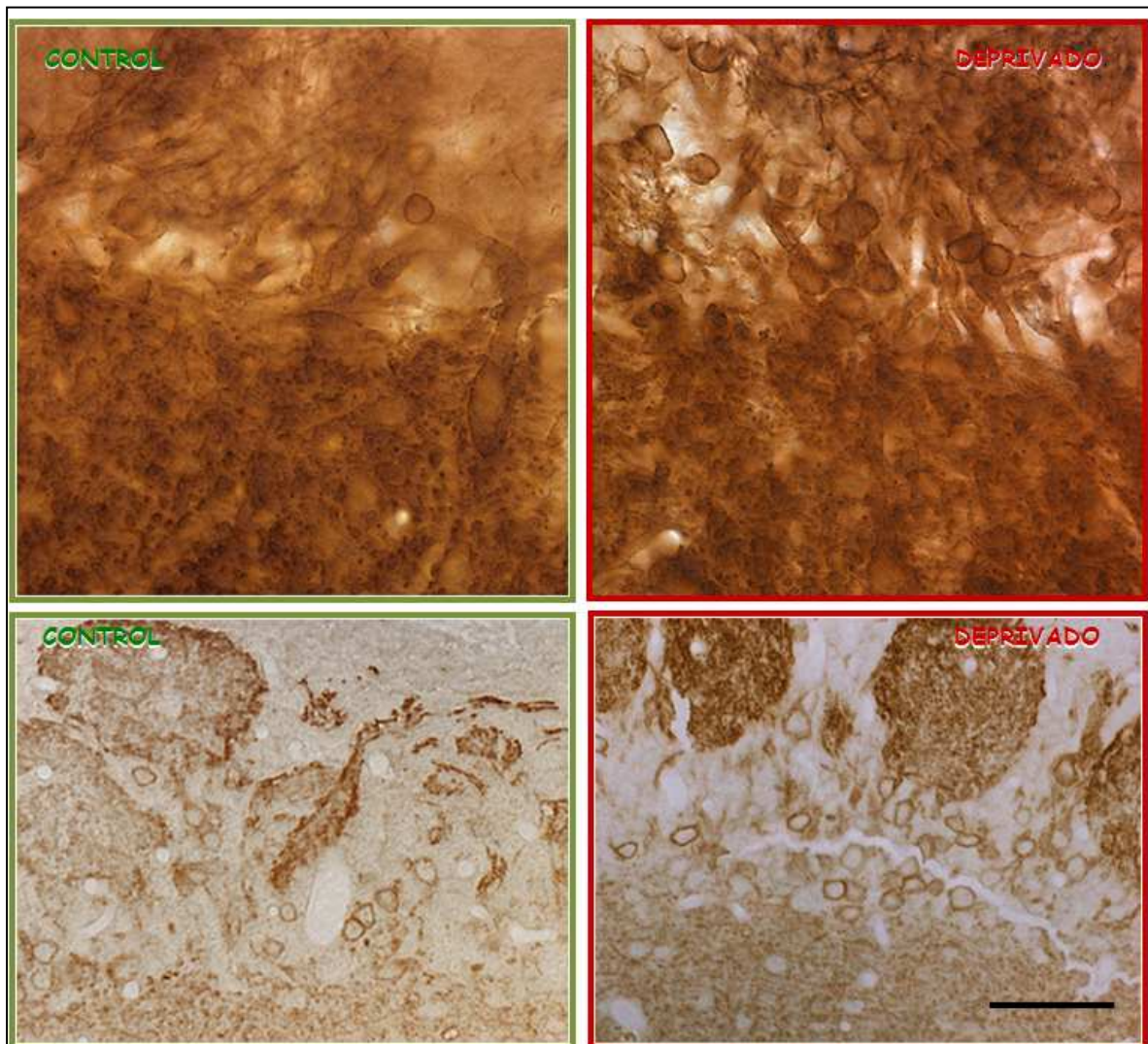
las caudales. Se trata de un incremento que puede detectarse en todas las capas bulbares inmunopositivas (fig. 59). En cuanto a la distribución dentro de cada capa, es bastante homogéneo, sin que hayamos podido poner de manifiesto variaciones regionales al comparar zonas medial, lateral, ventral y dorsal de las distintas capas. Respecto a la tipología neuronal y localización celular, los efectos de la privación en la expresión del mGluR1a afectan tanto a neuronas principales como a interneuronas, y es apreciable tanto en elementos somáticos como dendríticos (fig. 60).

**Efectos de la privación en la Capa Glomerular:** El incremento de expresión del mGluR1a en esta capa es debido principalmente a la presencia de un mayor número de elementos positivos, tanto de los procesos que constituyen el neuropilo del glómulo, como de somas de las células yuxtglomerulares que lo rodean, aunque tampoco es descartable una mayor densidad de inmunoprecipitado por presencia de mayor cantidad de antígeno (fig. 60).



**Figura 60.-** Fotomicrografías panorámicas de secciones semifinas de bulbo control (izda) y privado (dcha) inmunomarcadas en preinclusión para mGluR1a. El aumento de marcaje tiene lugar tanto en cuerpos celulares (especialmente evidente en la CGL) como en los elementos constituyentes del neuropilo. También se puede apreciar la marcada reducción de espesor que sufre la CPE tras la privación. Barra de escala = 75  $\mu$ m.

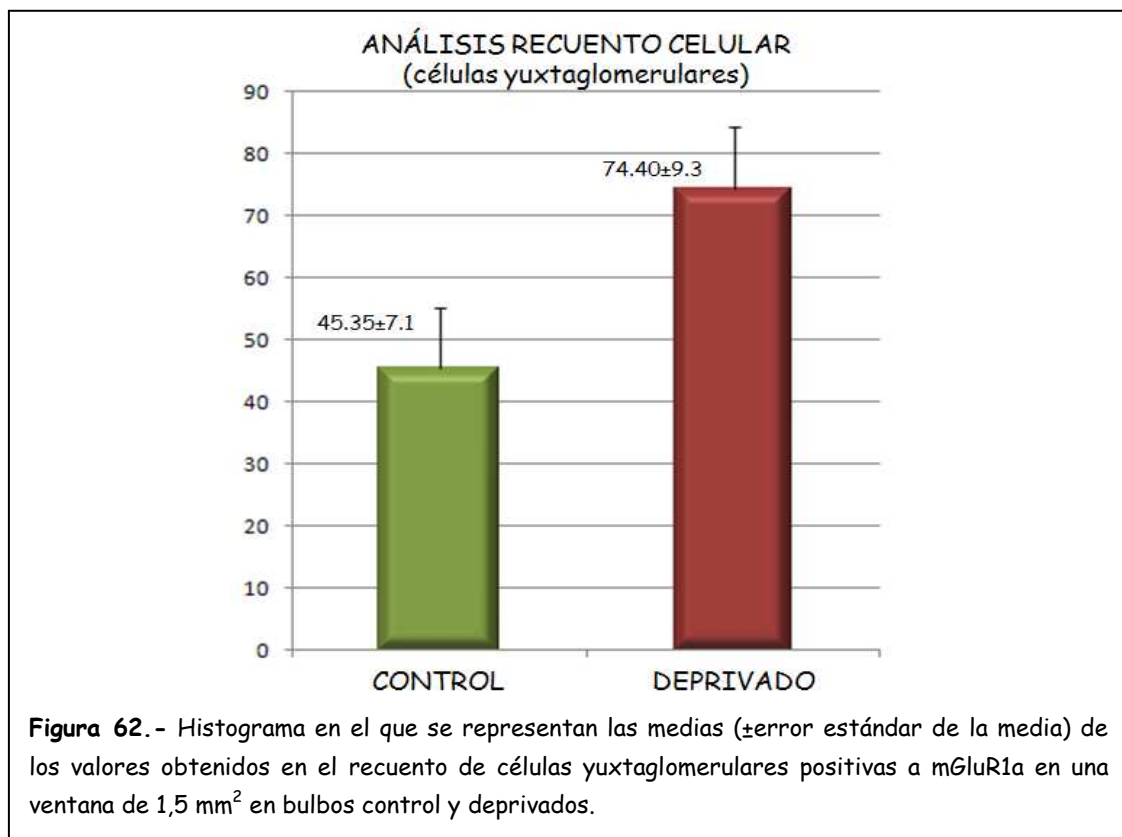
El marcaje del neuropilo glomerular es bastante intenso en el bulbo control, por lo que el aumento, en ocasiones, no parece todo lo llamativo que es en realidad. Esto ocurre especialmente en secciones gruesas (de vibratomo) y a grandes aumentos. Sin embargo, cuando se observan secciones semifinas en las que se había realizado la inmunohistoquímica en preinclusión, la diferencia de intensidad del marcaje se hace más que evidente, quedando claro que se produce un aumento de elementos del neuropilo mGluR1a-positivos tras la deprivación (fig. 61).



**Figura 61.** - El aumento de células yuxtglomerulares mGluR1a-positivas en el bulbo deprivado (dcha) es evidente en comparación con el bulbo control (izda) en secciones de vibratomo (imágenes superiores), pero debido a la abundancia de elementos marcados del neuropilo, la observación individual es más sencilla al realizarla sobre secciones semifinas (imágenes inferiores) de bulbo control (izda) y bulbo deprivado (dcha). Barra de escala = 50  $\mu$ m (imágenes superiores) y 100  $\mu$ m (imágenes inferiores).

El incremento de células yuxtglomerulares que expresan el receptor es uno de las consecuencias más evidentes de la ausencia de estimulación olfatoria (fig. 62). De forma similar a como ocurre en el análisis del patrón de expresión del mGluR1a en condiciones control, a la hora de realizar la estimación del aumento de elementos positivos, la gran densidad de perfiles mGluR1a-positivos en esta zona dificulta la aplicación de métodos densitométricos basados en la discriminación de blanco-negro sobre imágenes digitalizadas. Por ello, realizamos el recuento celular directamente sobre imágenes capturadas (tal como se detalla en la sección Material y Métodos) de los bulbos control y privado.

Este aumento supone que en ausencia de estimulación olfatoria detectamos un 64.05% más de células yuxtglomerulares positivas para mGluR1a. El análisis estadístico de los datos tras aplicar el test de Wilcoxon con la corrección de Bonferroni demostraron que hay un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ ) del número de somas pertenecientes a células yuxtglomerulares inmunopositivas para mGluR1a en los bulbos privados con respecto a los bulbos control.





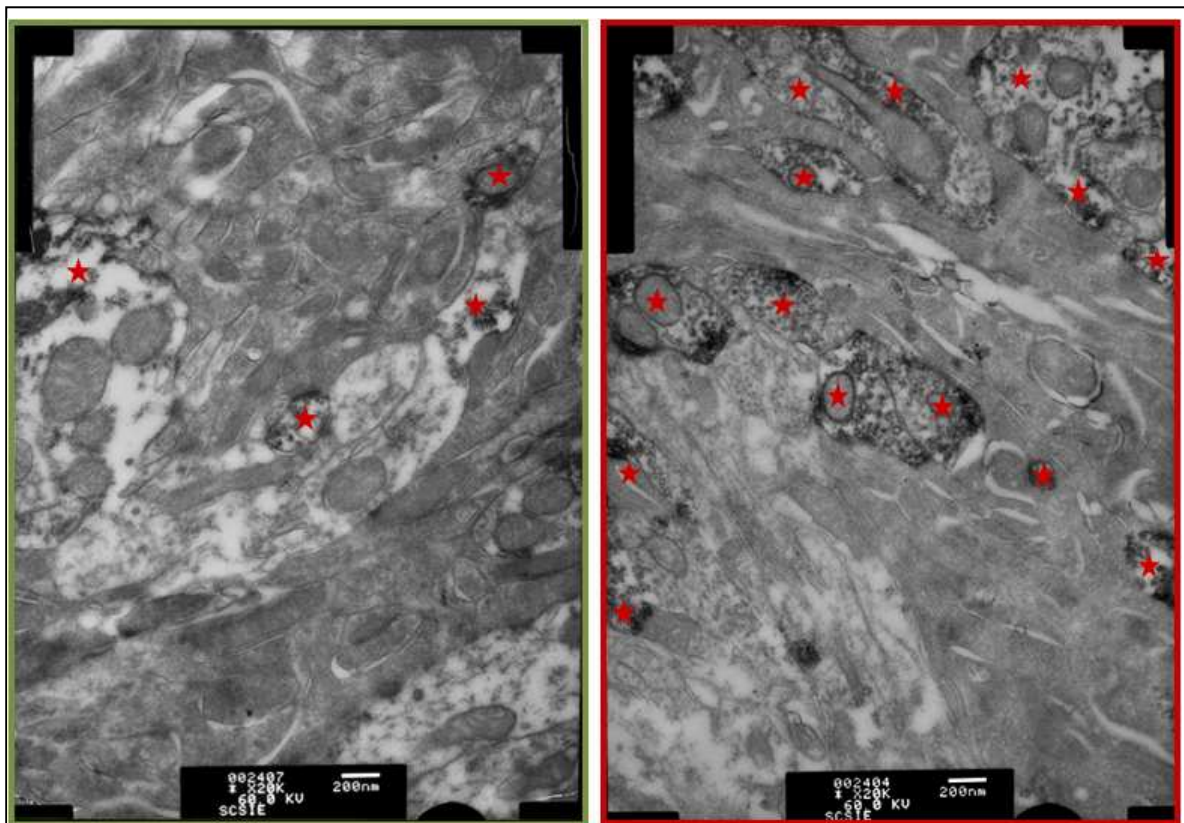
Dado que en condiciones de privación aumenta la población de neuronas yuxtaglomerulares, asumimos que este incremento de neuronas debe contribuir, obviamente, al incremento de marcaje en el neuropilo. Debemos tener en cuenta que las dendritas de las neuronas de proyección, mitrales y empenachadas, también alcanzan el glomérulo y, por tanto, forman parte del neuropilo, de esta región. En este sentido cabe plantearse si estos perfiles contribuyen también al incremento de marcaje en la CGL.

Los evidentes procesos dendríticos de las neuronas de proyección facilitan su observación especialmente en la zona límite de la CGL con la CPE. Como se observa en la figura 63, existe un aumento de procesos dendríticos inmunopositivos a mGluR1a tras la privación. Si, como se comentó con anterioridad, en condiciones normales prácticamente todas las neuronas de proyección expresaban (al menos en su soma y dendritas proximales) el receptor, este dato supone que debe haber un incremento de acúmulo del receptor en la región apical de las dendritas de estas células principales.



En conjunto, estos resultados indican que el incremento de expresión del mGluR1a en el núcleo glomerular es consecuencia de la expresión en nuevos elementos neuronales que contribuyen con sus dendritas al neuropilo glomerular y a una

concentración mayor del receptor en la región distal de elementos dendríticos, ya positivos en condiciones control. La evidencia más determinante que apoya estos resultados es la comparación de las imágenes obtenidas a microscopía electrónica en condiciones control vs deprivación (fig. 64). Éstas confirman el notable aumento de perfiles dendríticos mGluR1a-positivos que se observan en los glomérulos tras la deprivación. Además, al menos parte de estos perfiles dendríticos, pueden ser identificados como dendritas de células mitrales y/o empenachadas y es notablemente mayor en el bulbo deprivado que en el bulbo control.

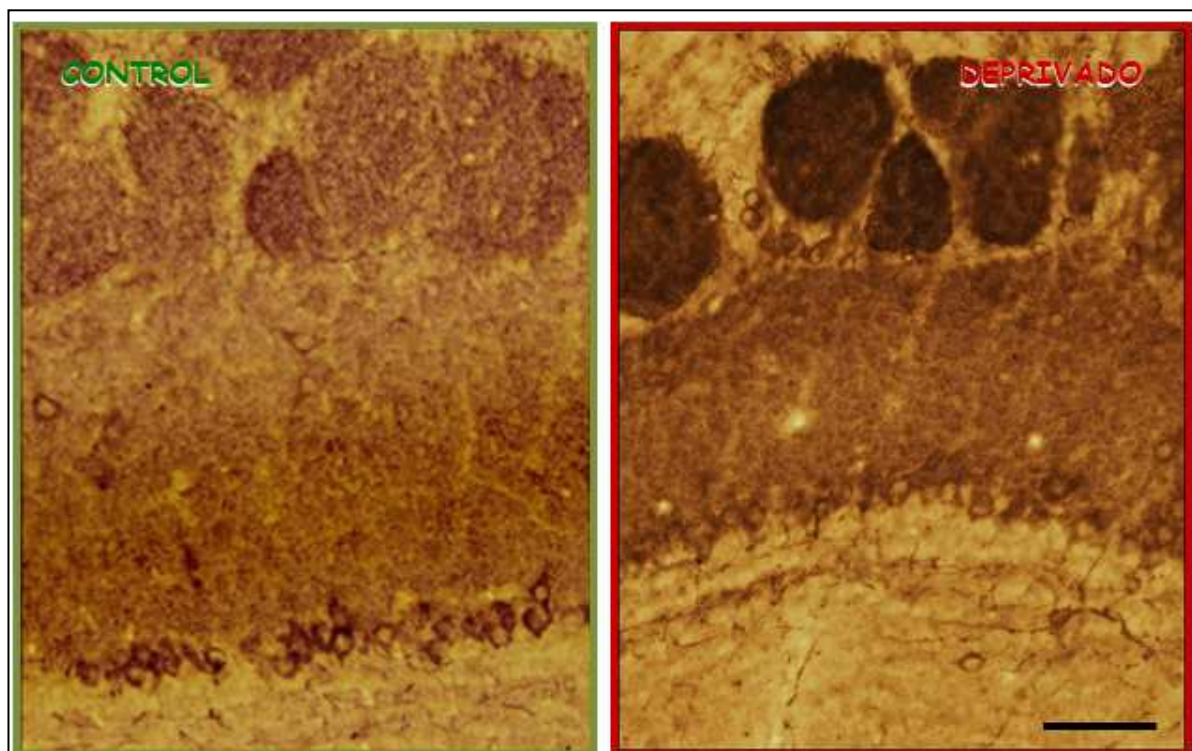


**Figura 64.** - Micrografías electrónicas realizadas a la misma magnificación de glomérulos de bulbo control (izda) y bulbo deprivado (dcha) donde se observan perfiles dendríticos de células yuxtglomerulares, mitrales y empenachadas, recibiendo contactos de los axones de las NROs. Nótese la abundancia de perfiles dendríticos inmunopositivos (marcados con estrellas rojas) para mGluR1a en condiciones de deprivación (dcha) frente a la condición control (izda).

Además mediante este estudio ultraestructural no hemos detectado la presencia de mGluR1a en los terminales axónicos del nervio olfatorio en el bulbo deprivado, al igual que ocurre en el bulbo control. Por ello podemos afirmar que el

único responsable del incremento de marcaje que se produce en el neuropilo de los glomérulos tras la deprivación olfatoria es el componente dendrítico (fig. 64).

**Efectos de la deprivación en la Capa Plexiforme Externa:** La intensidad del inmunomarcaje para el mGluR1a en la CPE también se incrementa de forma notable en el bulbo ipsilateral a la oclusión. Este incremento hace que la diferenciación de la intensidad del marcaje en el neuropilo en las dos subcapas observadas en el patrón de expresión del bulbo control, desaparezca en el caso del deprivado y adquiera una apariencia homogénea en toda la extensión de la capa (fig. 59 y 65). El responsable mayoritario de este incremento es, evidentemente, el neuropilo, ya que es el principal constituyente de esta capa, y está asociado al aumento de expresión del mGluR1a en los procesos dendríticos tanto apicales como laterales de cM/Es que se extienden atravesando esta capa, como ya hemos comentado.

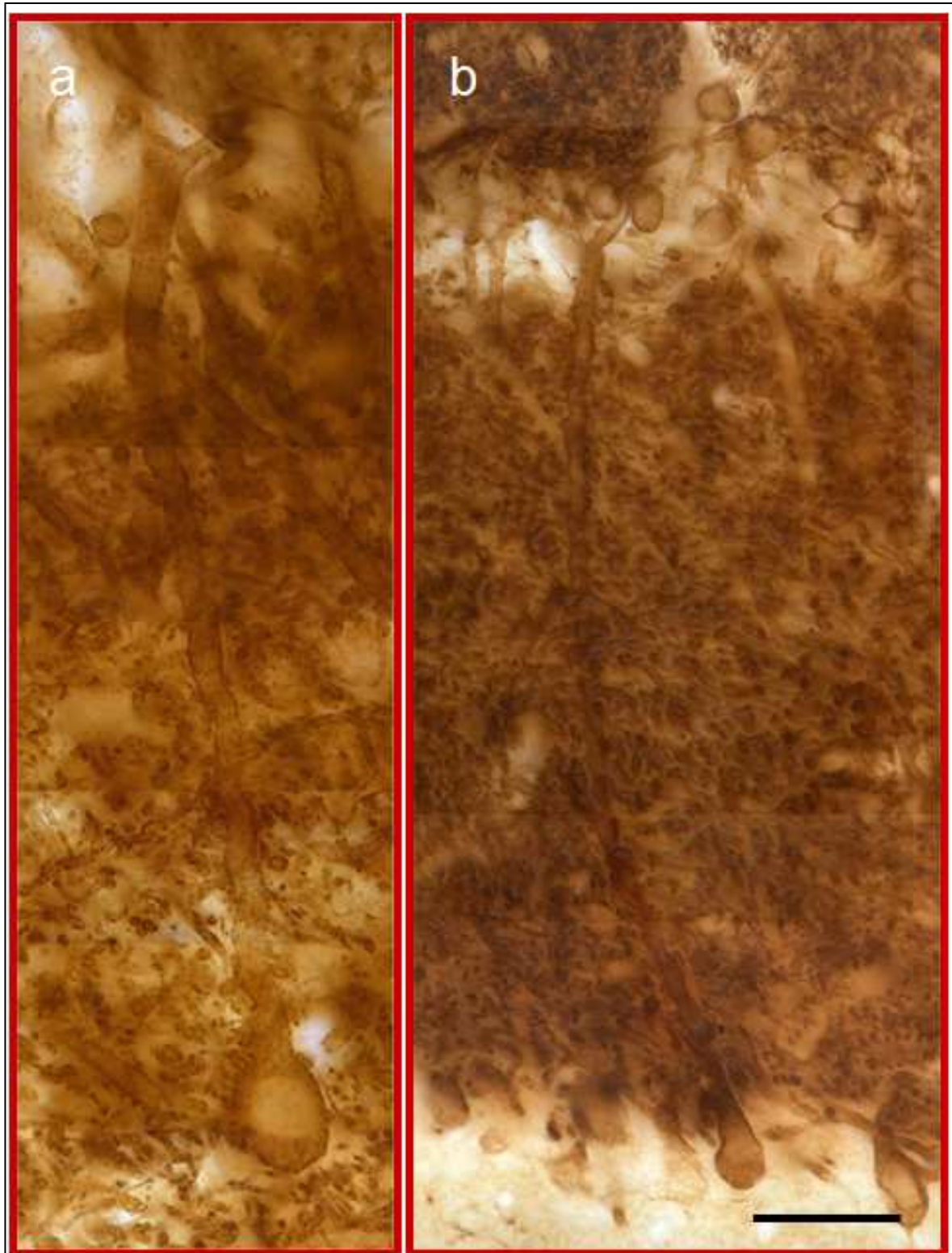


**Figura 65.** - Secciones de criostato inmunomarcadas para el mGluR1a en las que se puede observar el incremento de la intensidad de marcaje en la CPE en el bulbo deprivado (dcha) respecto al control (izda). Barra de escala = 125  $\mu$ m.

Este incremento se debe, en gran medida, a una redistribución subcelular del mGluR1a, de tal manera que el receptor, además de ocupar las mismas zonas que ocupa en condiciones normales, aparece en tramos dendríticos en los que anteriormente se expresaba en menor densidad. De hecho, mientras que en condiciones control es habitual observar el inmunomarcaje principalmente en porciones proximales del tronco dendrítico y/o en las porciones más distales, en el bulbo deprivado el aumento de expresión del mGluR1a se traduce en su localización a lo largo de toda la extensión del tronco dendrítico. Esto nos ha permitido, en las secciones más favorables, visualizar el recorrido completo de las dendritas apicales de células mitrales y empenachadas, obteniendo imágenes poco usuales en secciones procesadas para la técnica inmunohistoquímica (fig. 66).

En el incremento del marcaje para el mGluR1a en la CPE no parece intervenir un aumento del número de somas mGluR1a-positivas. La comparación del patrón de expresión del bulbo control con el bulbo ipsilateral a la oclusión no muestra diferencias en la cantidad de células inmunopositivas. La expresión del mGluR1a en los somas de la población de células empenachadas, por tanto, no se ve afectada por la pérdida de estimulación olfatoria, al menos en cuanto a número, aunque sí en intensidad.

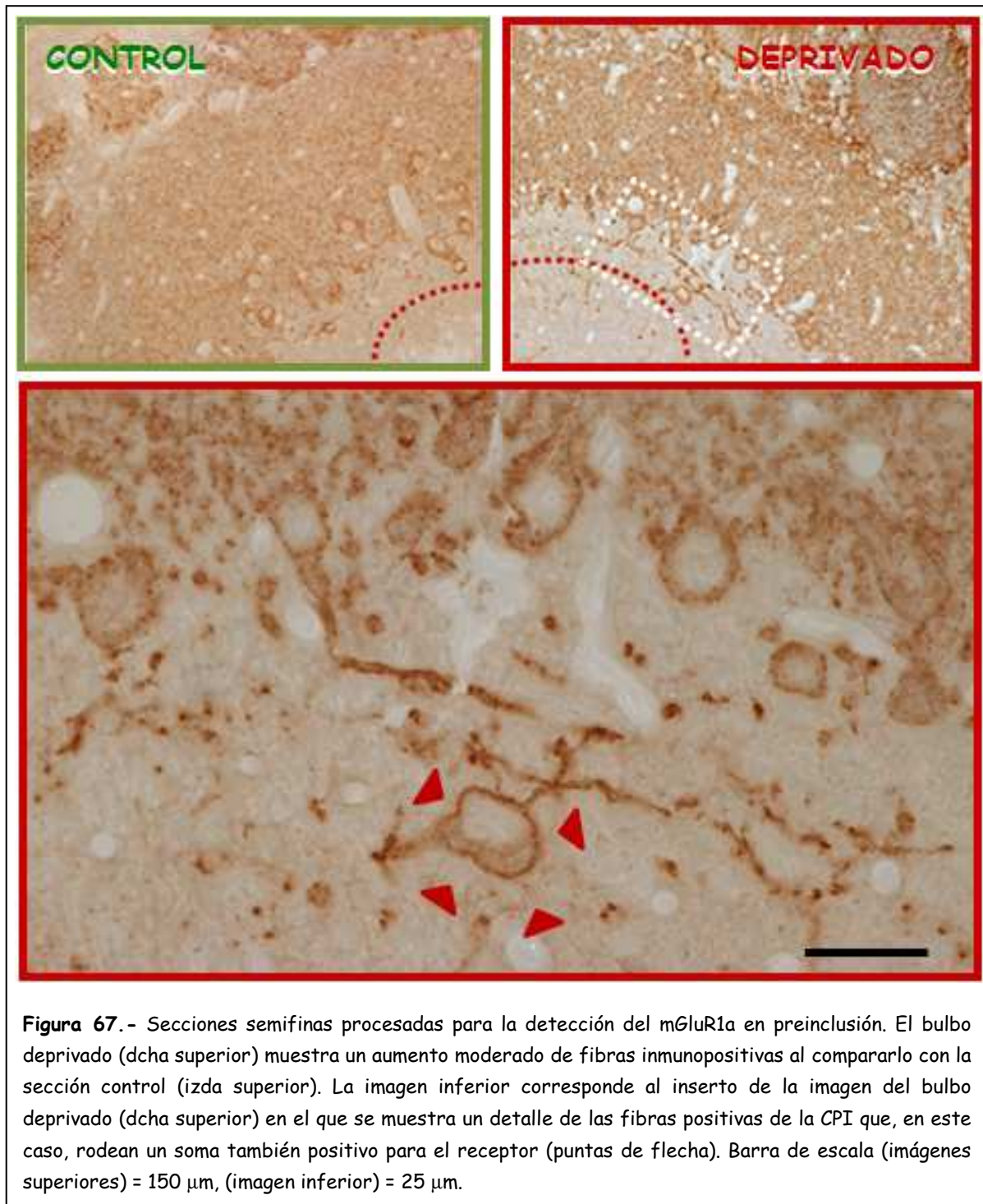
Por otro lado, debemos tener en cuenta que el proceso de deprivación provoca una notable reducción de las dimensiones de la CPE (ver fig. 65). En ausencia de estimulación olfatoria, la CPE sufre un proceso de contracción que resulta en una disminución de aproximadamente un 25% del volumen laminar (Henegar y Maruniak, 1991; Brunjes, 1994). Esta contracción parece influir en el incremento de marcaje de la CPE, de manera que la mayor concentración de elementos distribuidos en un menor volumen conlleva una mayor intensidad de marcaje.



**Figura 66.-** Fotomontajes de series de fotomicrografías que han sido capturadas en diferentes planos focales, para la reconstrucción completa de los recorridos dendríticos. El aumento de expresión del mGluR1a en los procesos dendríticos tanto de células empenachadas (a) como de células mitrales (b) nos han permitido trazar el recorrido de las dendritas principales de estas neuronas en toda su longitud, desde el soma hasta la llegada al glomérulo de destino, y atravesando, en el caso de la célula mitral (b), toda la extensión de la CPE. Barra de escala en (a) = 25  $\mu$ m, en (b) = 40  $\mu$ m.

**Efectos de la privación en la Capa de las Células Mitrals:** La privación olfatoria no parece revelar cambios evidentes en la CCM. En condiciones control el patrón de expresión del mGluR1a muestra toda la población de células mitrales como inmunopositivas para el receptor. En el bulbo ipsilateral a la privación observamos también que todas las células mitrales son mGluR1a-positivas. El patrón no se modifica, al menos en lo que concierne a los somas de las células mitrales, que son los que definen esta capa. Pero, como hemos visto anteriormente, hay una mayor cantidad de procesos dendríticos positivos al mGluR1a en condiciones de privación. Por ello podemos considerar que, de forma similar a como ocurre en las células empenachadas, la pérdida de estimulación aferente dispara la expresión del receptor en porciones dendríticas mientras que se mantiene, más o menos constante, en los somas. También en esta población es posible seguir completamente el recorrido de la dendrita principal de las células mitrales, en secciones favorables, como se muestra en la figura 66, mientras que en los bulbos control, la ausencia de marcaje en partes del tramo dendrítico hacía imposible seguir durante todo su recorrido las prolongaciones dendríticas.

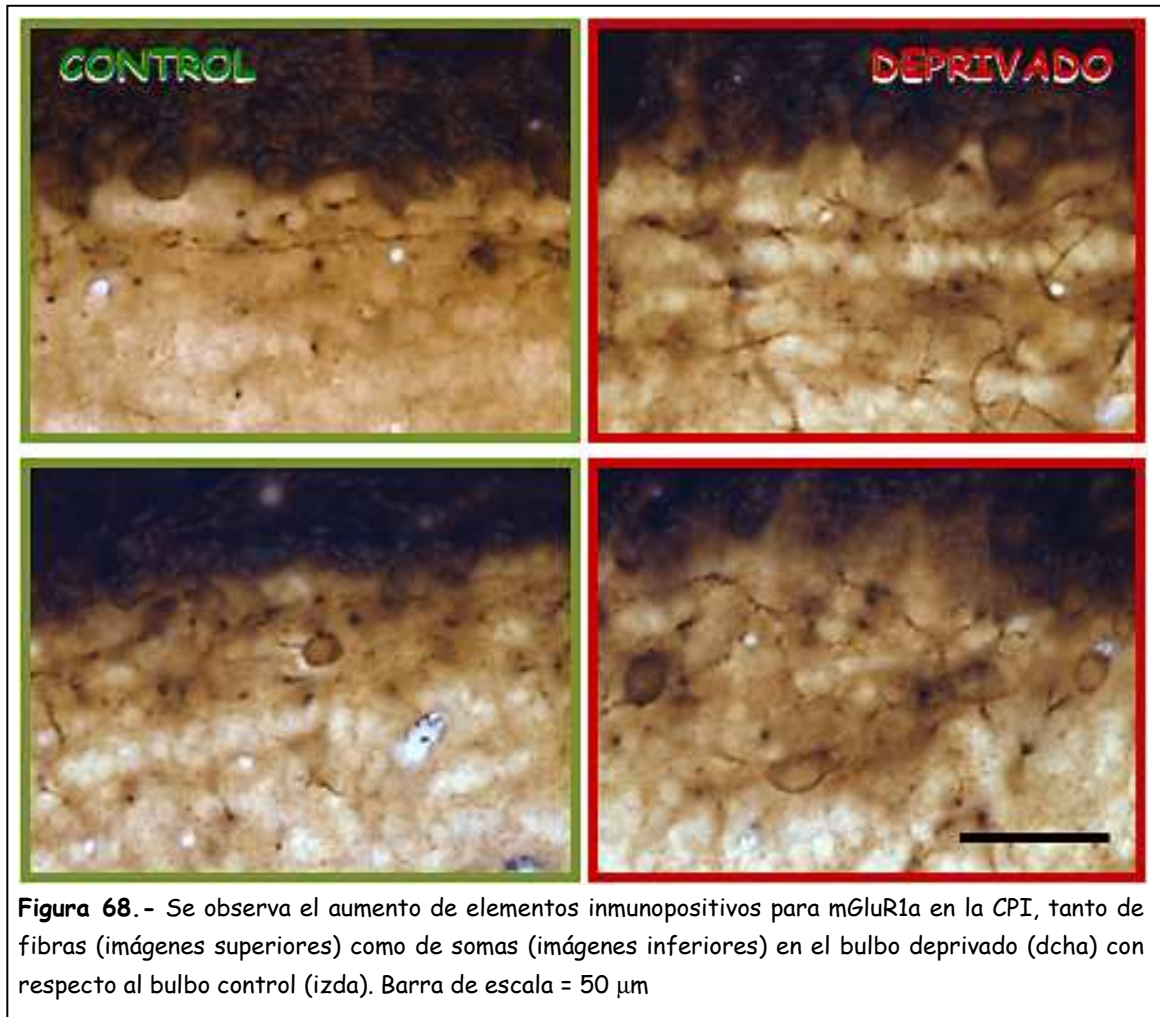
**Efectos de la privación en la Capa Plexiforme Interna:** En la CPI también tiene lugar un incremento de expresión del mGluR1a cuando se elimina la entrada de estimulación olfatoria. Este efecto es más moderado, cuantitativamente, que en otras capas, pero más evidente, debido a la baja densidad de elementos inmunopositivos que existe en condiciones control. En el bulbo privado observamos un mayor número de elementos positivos, tanto de somas como de fibras, en comparación con el bulbo control (fig. 67). Estos elementos presentan una distribución y morfología similar al patrón de marcaje en condiciones control y son clasificadas mayoritariamente como células horizontales, uno de los subtipos de células profundas de axón corto.



**Figura 67.** - Secciones semifinas procesadas para la detección del mGluR1a en preinclusión. El bulbo deprivado (dcha superior) muestra un aumento moderado de fibras inmunopositivas al compararlo con la sección control (izda superior). La imagen inferior corresponde al inserto de la imagen del bulbo deprivado (dcha superior) en el que se muestra un detalle de las fibras positivas de la CPI que, en este caso, rodean un soma también positivo para el receptor (puntas de flecha). Barra de escala (imágenes superiores) = 150  $\mu$ m, (imagen inferior) = 25  $\mu$ m.

Mientras que en las secciones del bulbo control es habitual observar zonas en que apenas se detectan unas pocas fibras y algún soma inmunomarcado, en los bulbos

sometidos a privación cualquier zona de la CPI muestra grupos de somas y fibras mGluR1a-positivos entrecruzados (fig. 68).



### RESUMEN DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS EFECTOS DE LA DEPRIVACIÓN OLFATORIA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL mGluR1a.

Según el estudio inmunohistoquímico, la ausencia de estimulación olfatoria produce un reajuste de expresión del mGluR1a en el bulbo olfatorio que se traduce en un aumento de síntesis del receptor, que se manifiesta en las capas y poblaciones celulares inmunopositivas, pero no se extiende a las capas o tipos neuronales que en condiciones normales son mGluR1a-negativas; de este modo, se mantiene así el patrón



lamina característico para este receptor, en el que sólo la CNO y la CCG carecen de elementos inmunopositivos.

Las poblaciones celulares mGluR1a-positivas responden a la privación, aumentando la síntesis y expresión de este receptor, no sólo revelando un aumento en el número de elementos marcados, sino que, también tiene lugar una redistribución del receptor, de tal modo que, sin abandonar su localización normal, éste aparece en nuevas regiones dendríticas. Esta mayor presencia en dominios dendríticos es especialmente llamativa en la población de cM/Es. La privación parece no afectar al número de células empenachadas y mitrales que expresan el mGluR1a, manteniéndose constante el número de somas con respecto a la condición control ya que en estas condiciones la práctica totalidad de la población era positiva.

Los resultados inmunohistoquímicos muestran que la reducción de la actividad aferente también provoca el aumento de la expresión del mGluR1a en la población de células yuxtglomerulares. En este caso no sólo se incrementa la densidad del inmunomarcaje en las porciones dendríticas de estas neuronas, sino que también aumenta el número de células yuxtglomerulares que expresan el receptor. Algo similar ocurre en la CPI donde se detecta un aumento de expresión del receptor tanto en somas como en procesos dendríticos, que pertenecen a células horizontales mayoritariamente.

El análisis inmunohistoquímico detecta la presencia del receptor no sólo en la membrana plasmática sino que también observamos una distribución citosólica, y por tanto, no funcional (Romano y cols., 1996a; Copani y cols., 2000). Basándonos exclusivamente en las imágenes obtenidas por métodos inmunohistoquímicos y a microscopía óptica es difícil definir con exactitud la localización subcelular del receptor (fundamentalmente debido a la difusión del precipitado del cromógeno), por lo que no podemos afirmar que un aumento de expresión del receptor tras privación conlleve un aumento de su presencia en membrana y, por tanto, de actividad. Más aún en el caso del mGluR1a, cuya funcionalidad queda determinada, no sólo por su localización en membrana, sino también por su conformación dimérica (Copani y cols., 2000; Romano y cols., 2001). Por ello, tras el estudio de caracterización neuroquímica

de las neuronas mGluR1a-positivas, que describiremos a continuación, ampliaremos nuestro estudio a través de un análisis proteómico mediante electroforesis y transferencia tipo Western (Westernblotting) para así obtener datos complementarios a los ofrecidos en el estudio neurohistológico.

## ESTUDIO DE COLOCALIZACIÓN. CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DE LAS NEURONAS POSITIVAS A mGluR1a.

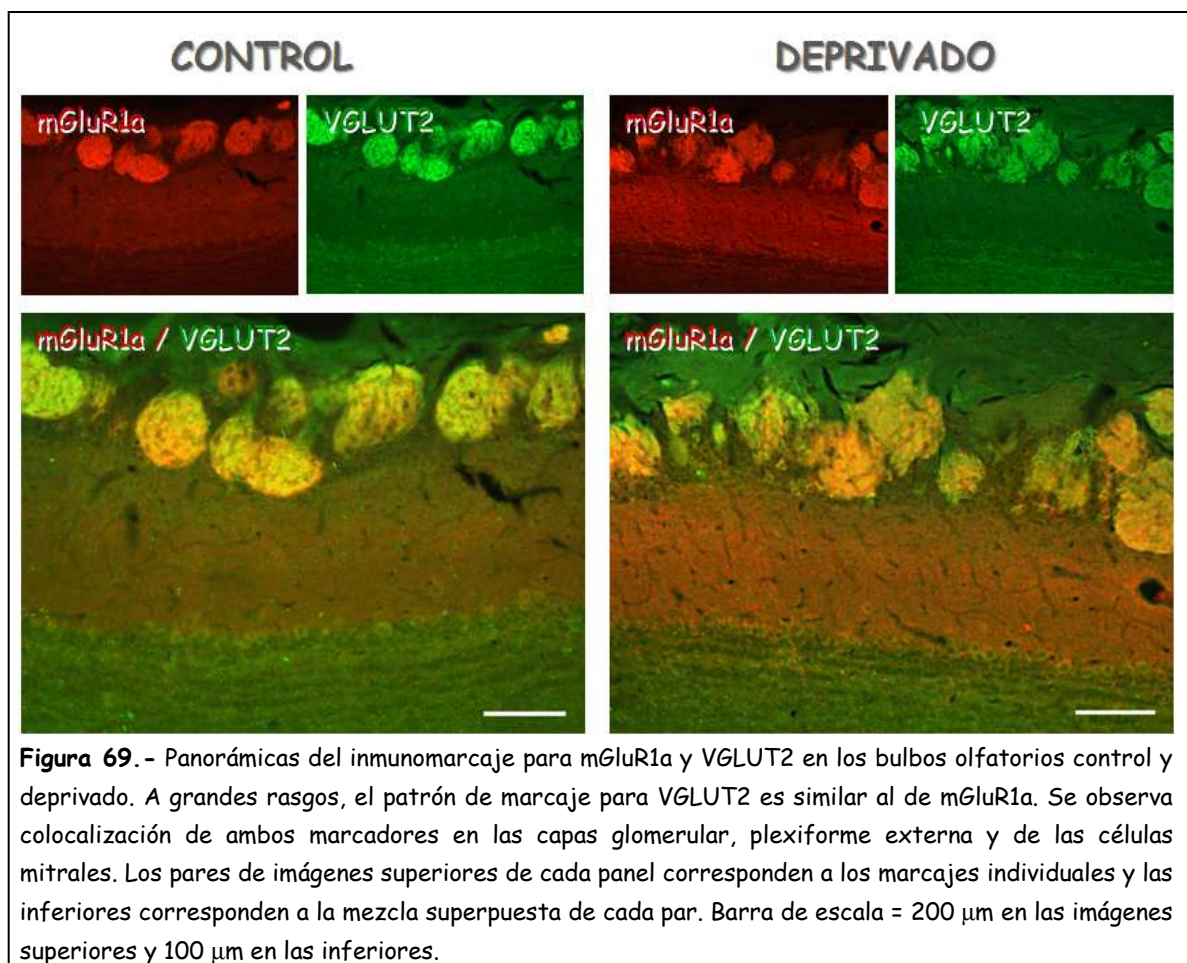
Como complemento a la descripción realizada de los elementos neuronales que expresan el receptor mGluR1a, nos propusimos caracterizar más detalladamente estas neuronas. Para ello realizamos estudios de colocalización mediante inmunofluorescencia, combinando el marcaje para mGluR1a con varios marcadores, que de acuerdo con los datos disponibles, serían susceptibles de ser coexpresados en estas mismas neuronas, hecho que nos permitiría definir aún más las poblaciones de células mGluR1a-positivas e inferir su conectividad y participación en la circuitería bulbar. En concreto, para estudiar la naturaleza glutamatérgica de las neuronas mGluR1a positivas utilizamos el VGLUT2 un marcador específico éstas. Además utilizamos tirosina hidroxilasa, calbindina D-28k y calretinina, clásicos marcadores de células periglomerulares y neurocalcina y colecistoquinina, como marcadores de una población muy numerosa de cEE el primero y de cES y cEM el segundo.

### **Coexpresión de mGluR1a con VGLUT2. Caracterización de neuronas glutamatérgicas.**

Teniendo en cuenta que el mGluR1a se localiza en los elementos postsinápticos (Baude y cols., 1993; Luján y cols., 1996), es evidente que las neuronas mGluR1a-positivas son neuronas glutamatoceptivas. En el estudio de su caracterización neuroquímica nos planteamos, en primer lugar, la posibilidad de que esas neuronas fueran, además, glutamatérgicas. Las razones que apoyaban el que investigáramos esta posibilidad eran i) que además de las cM/Es, gran parte de células yuxtglomerulares presentaban las características morfológicas típicas de células empenachadas, que son consideradas de carácter excitatorio, y ii) se ha sugerido que el mGluR1a está implicado en la aparición de respuestas de larga duración de los procesos de autoexcitación de células glutamatérgicas (mediados por *spillover* de glutamato) (Khan y Sobel, 2004). Para ello realizamos estudios de coexpresión del

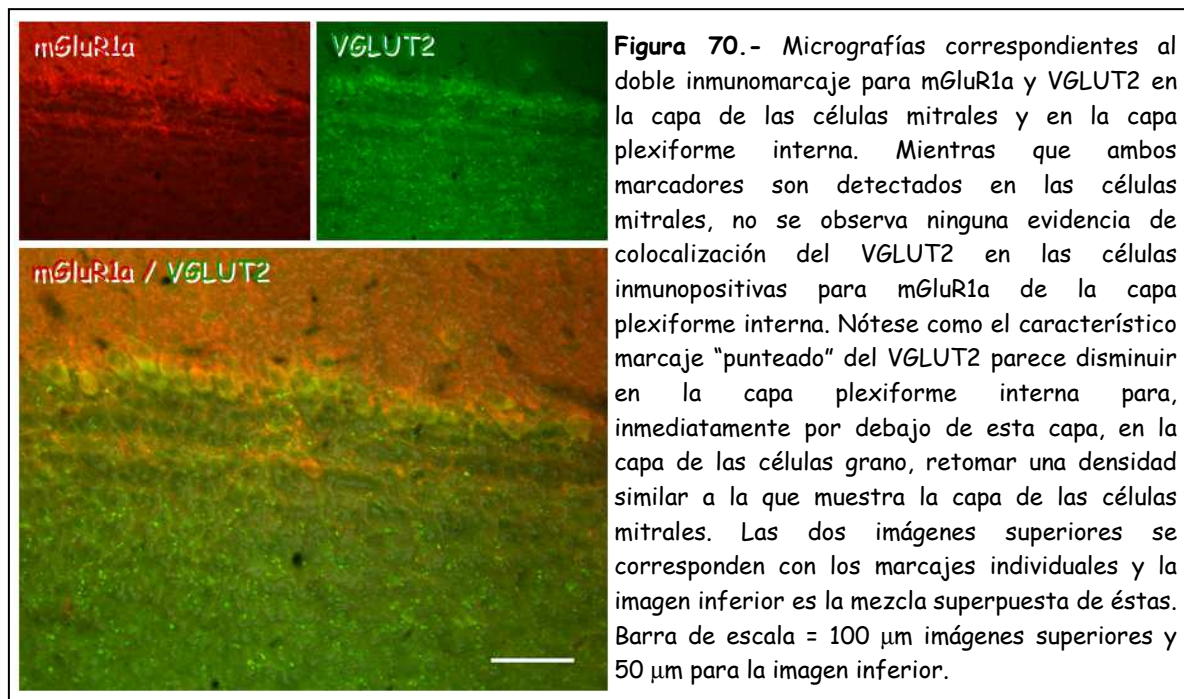
receptor mGluR1a con el transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2). El VGLUT2 interviene en la internalización de glutamato en las vesículas sinápticas mediante un gradiente electroquímico de protones establecido a través de la membrana de la vesícula. La presencia de VGLUT2 en neuronas determina su fenotipo glutamatérgico.

En la capa glomerular pudimos observar cómo la práctica totalidad de las células positivas a mGluR1a coexpresaban también VGLUT2, es decir, estas neuronas glutamatoceptivas eran, a su vez, glutamatérgicas. En estos casos, la mayor parte de los elementos inmunomarcados se correspondía morfológica y topológicamente tanto con cEE como con cPG, si bien las primeras eran más abundantes. En ningún caso observamos marcaje en neuronas que pudieran tener características propias de cSAC. Ocasionalmente, sin embargo, podían observarse somas neuronales positivos para VGLUT2 que eran negativos para el receptor, al igual que otros sólo inmunomarcados para mGluR1a (fig. 69).



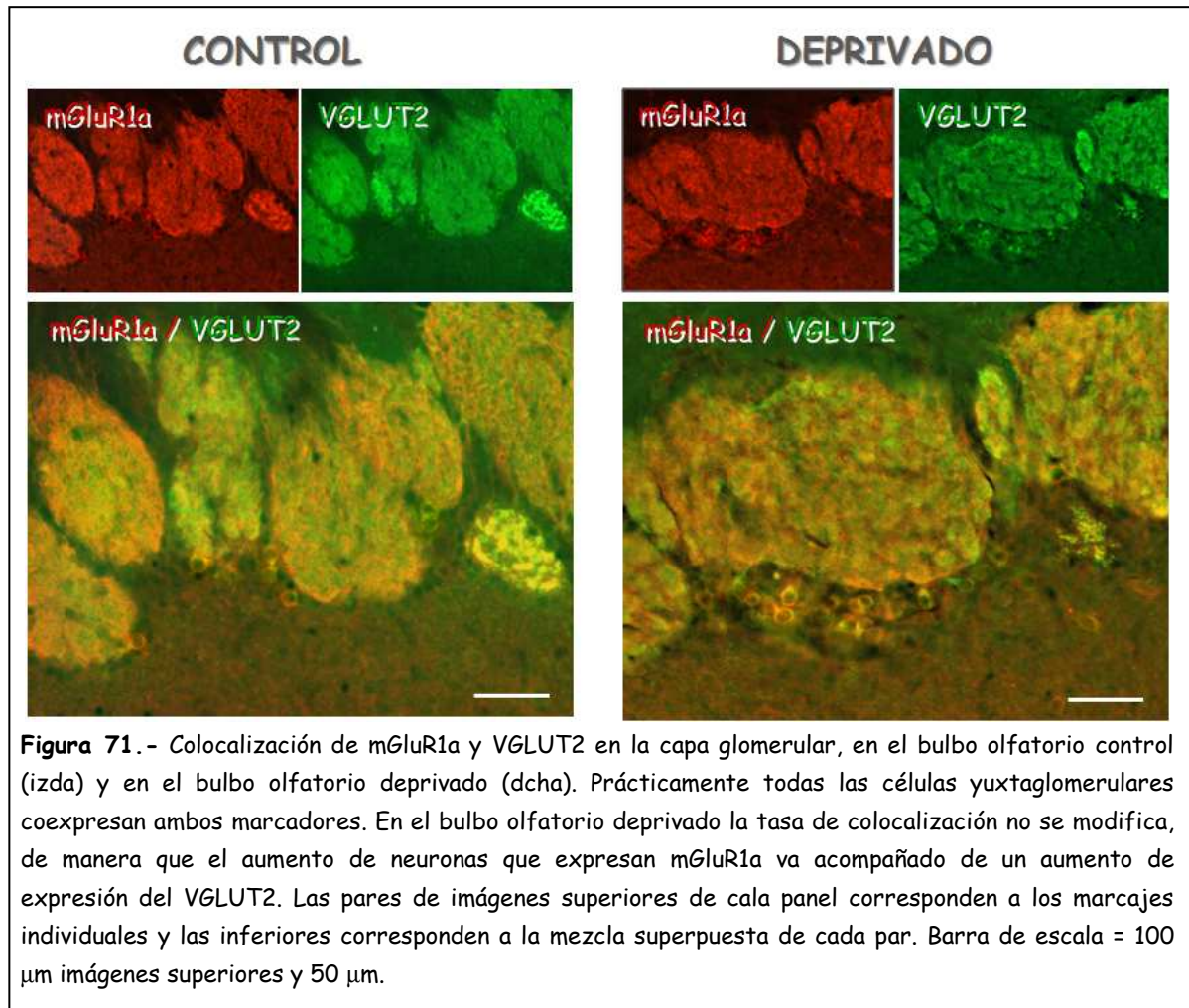
En la capa plexiforme externa observamos un moderado número de neuronas positivas a VGLUT2 de las que, un gran número, aunque no todas, con morfología de células empenachadas, coexpresaba también mGluR1a. Sin embargo, cuando era posible diferenciar el perfil neuronal del intenso marcaje del neuropilo, comprobamos que todas las células empenachadas positivas para el mGluR1a coexpresaban también el transportador VGLUT2 (fig. 69).

Por otra parte, hemos observado que ambos marcadores, mGluR1a y VGLUT2, colocalizan, como era de esperar en función de los datos bibliográficos disponibles, en toda la población de células mitrales. Sin embargo, las células horizontales mGluR1a-positivas, situadas inmediatamente bajo células mitrales, en la CPI, fueron siempre inmunonegativas para VGLUT2 (fig. 70).



Tras deprivación olfatoria, es llamativo que el aumento del número de neuronas yuxtglomerulares positivas a mGluR1a no provoca una reducción en la tasa de coexpresión con VGLUT2, sino que ésta se mantiene en prácticamente la totalidad de las células marcadas. Dicho de otro modo, el aumento en el número de elementos positivos a mGluR1a se acompaña de un aumento en el número de elementos positivos a VGLUT2, y que el aumento en la expresión de ambos marcadores tiene lugar en las mismas neuronas. Así, podemos decir que ambos marcadores sufren un proceso de

regulación de su expresión similar como consecuencia de la ausencia de estimulación olfatoria (ver fig. 71). Como se discutirá oportunamente, es probable que estas neuronas ya expresaran estos marcadores, pero en cantidades no detectables mediante la técnica inmunohistoquímica. El proceso de deprivación, por tanto, regularía positivamente su tasa de expresión, lo cual haría posible la puesta de manifiesto de estos elementos.



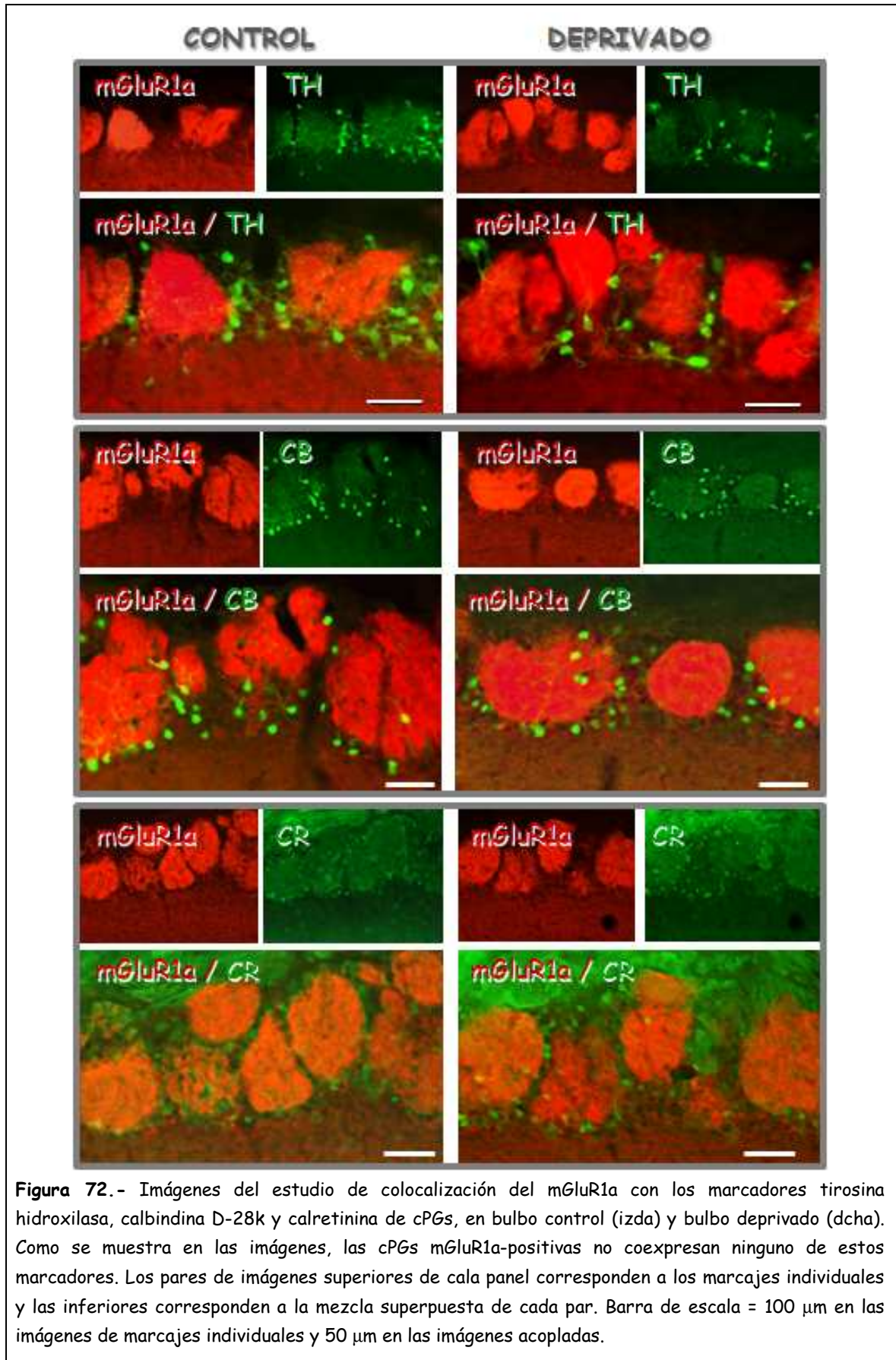
En resumen, en función de los resultados obtenidos en este estudio podemos asegurar que, con la salvedad de las células horizontales de la CPI, las células glutamatoceptivas que expresan mGluR1a son neuronas glutamatérgicas y, por tanto, de carácter excitatorio. Este dato es importante, fundamentalmente en lo referente a las células yuxtaglomerulares, ya que una importante población de éstas se han descrito como GABAérgicas, y el hecho de que las mGluR1a positivas sean

glutamatérgicas excluye la posibilidad de que pertenecieran a la población de células yuxtglomerulares inhibitorias. Por ello, investigamos la posibilidad de que las células mGluR1a-positivas pudieran pertenecer a cualquiera de los otros grupos de células yuxtglomerulares definidas por la expresión de tirosina hidroxilasa, calbindina D-28k o calretinina (marcadores de células periglomerulares) o neurocalcina y colecistoquinina (como marcadores de células empenachadas).

### **Coexpresión de mGluR1a con tirosina hidroxilasa, calbindina D-28k y calretinina. Caracterización de tipos de Células Periglomerulares**

La expresión de tirosina hidroxilasa, calbindina D-28k y calretinina en la capa glomerular tiene lugar en poblaciones segregadas de cPG, aunque también son marcadores de cSAC, pero de poblaciones neuronales mucho menos numerosas. En cuanto a las cPG estos marcadores constituyen excelentes herramientas para identificar los dos grandes tipos de estas células. En concreto, las cPGs positivas a tirosina hidroxilasa (la mayor parte de las cuales son, además, GABAérgicas), junto con el grupo de GABAérgicas que son negativas para tirosina hidroxilasa, definen el tipo I. Éstas neuronas se caracterizan por recibir contactos directos de los axones del nervio olfatorio. Por su parte, las cPGs positivas a calbindina D-28k o calretinina definen al tipo II. Estas neuronas no reciben (o lo hacen de forma muy esporádica) estos contactos directos y, fundamentalmente, establecen contactos dendrodendríticos entre ellas, y con las dendritas de células principales (Toida y cols., 1998, 2000; Kosaka y Kosaka, 2005a, b).

En nuestro estudio de coexpresión de estos marcadores con las neuronas positivas a mGluR1a en la capa glomerular, los resultados han sido siempre negativos (fig. 72). En el caso de las cPGs positivas a tirosina hidroxilasa estos resultados eran esperables ya que la mayoría de ellas son GABAérgicas y, por tanto, no glutamatérgicas, mientras que las neuronas positivas a mGluR1a son glutamatérgicas.



**Figura 72.-** Imágenes del estudio de colocación del mGluR1a con los marcadores tirosina hidroxilasa, calbindina D-28k y calretinina de cPGs, en bulbo control (izda) y bulbo privado (dcha). Como se muestra en las imágenes, las cPGs mGluR1a-positivas no coexpresan ninguno de estos marcadores. Los pares de imágenes superiores de cada panel corresponden a los marcajes individuales y las inferiores corresponden a la mezcla superpuesta de cada par. Barra de escala = 100  $\mu$ m en las imágenes de marcajes individuales y 50  $\mu$ m en las imágenes acopladas.



De forma similar, para la identificación de neuronas periglomerulares tipo II, tampoco hemos encontrado en las cPGs inmunopositivas para calbindina D-28k o para calretinina ningún indicio de coexpresión con mGluR1a (fig. 72). Tan sólo, y restringido exclusivamente al soma de las células mitrales, hemos encontrado una débil coexpresión de mGluR1a con calretinina, dato esperable por otra parte, ya que la totalidad de células mitrales expresan el receptor y datos previos (Rogers y Résibois, 1992) habían descrito la expresión, aunque ligera, de calretinina en estas células.

A la luz de estos resultados podemos afirmar que prácticamente toda la población de cPGs inmunopositivas para mGluR1a son neuronas glutamatérgicas, dato que sólo había sido sugerido recientemente, y que rompe la clásica visión de esta estirpe neuronal como típicamente inhibitoria. Por otro lado, el hecho de que esta población de neuronas inmunopositivas para mGluR1a no coexpresen ninguno de los marcadores típicos que identifican y definen neuroquímicamente los diferentes tipos de cPGs, sugiere la existencia de un nuevo subtipo neuroquímico identificable por la expresión de mGluR1a. Este dato, junto con los aportados en nuestro estudio ultraestructural, en el que mostramos que la presencia de perfiles positivos a mGluR1a tiene lugar fundamentalmente en el compartimento axonal de los glomérulos y, por tanto, en contacto con los axones del nervio olfatorio, permite que definamos a las cPG positivas a mGluR1a como un nuevo subtipo neuroquímico dentro del tipo I y que no muestra solapamiento con los otros dos subtipos neuroquímicos descritos dentro de este tipo I (cPGs GABAérgicas y dopaminérgicas/GABAérgicas).

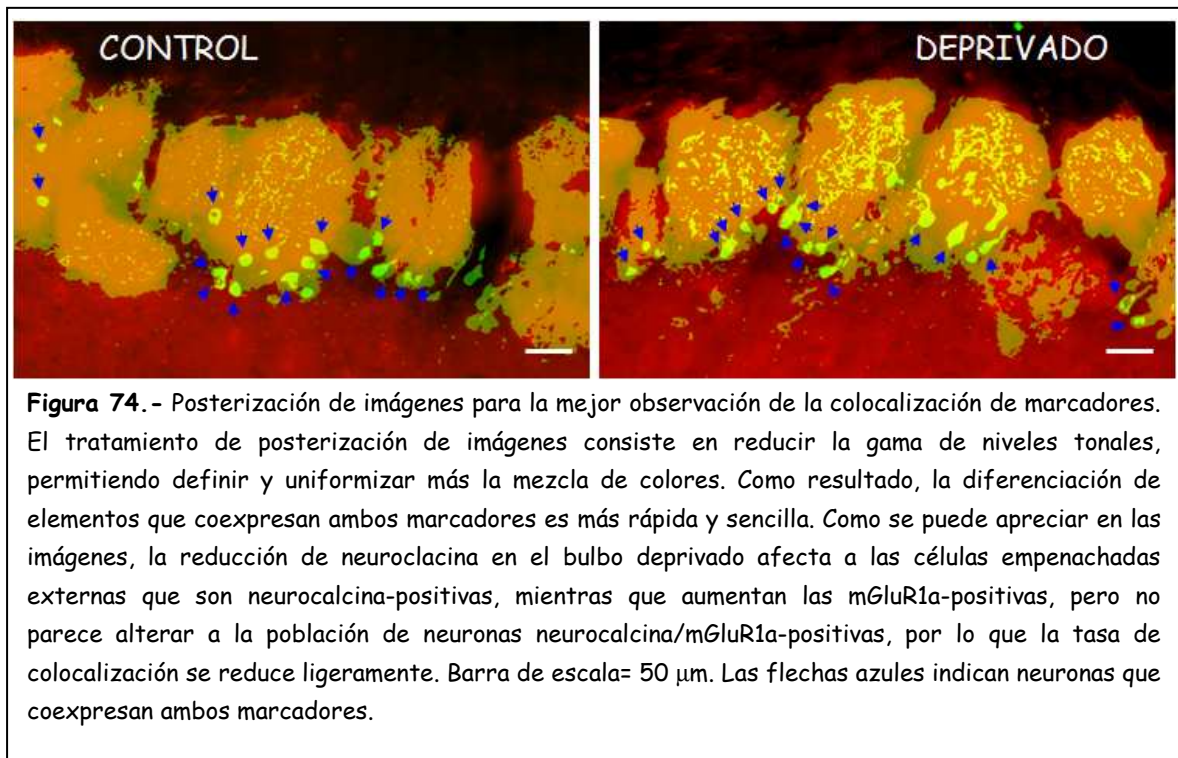
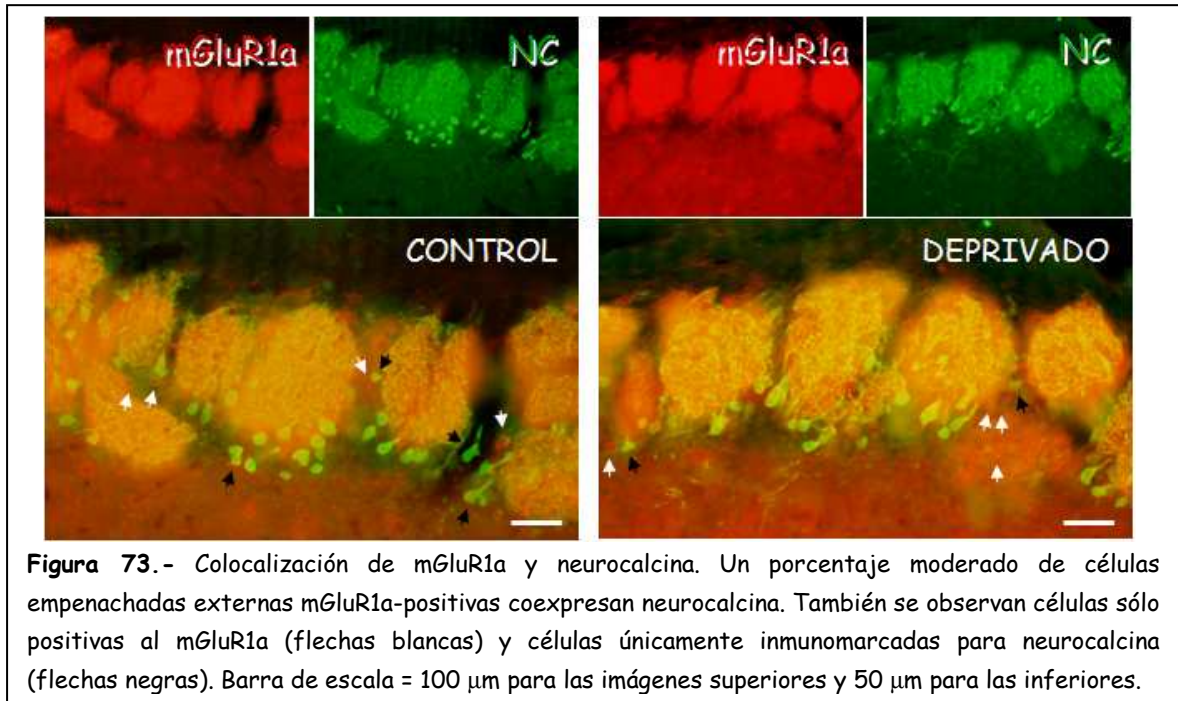
Por otro lado, en ausencia de estimulación olfatoria, y como observamos en la figura 72, el patrón de doble marcaje permanece inalterado. La ausencia de colocalización de mGluR1a con los diferentes marcadores de cPGs no se ve modificada en el bulbo olfatorio deprivado, aunque individualmente la expresión de cada uno de estos marcadores se vea afectada por la deprivación. En este sentido, mientras que el marcaje del mGluR1a aumenta en el bulbo deprivado, la expresión de tirosina hidroxilasa sufre un brusco descenso, la de calbindina D-28k se reduce ligeramente y la calretinina apenas modifica su expresión, en comparación con los bulbos control.

### **Coexpresión de mGluR1a con neurocalcina y colecistoquinina. Caracterización de Células Empenachadas Externas, Superficiales y Medias.**

La proteína ligante de calcio neurocalcina, y el neuropéptido colecistoquinina son inmejorables marcadores de células empenachadas. En el caso de la neurocalcina, ésta se expresa fundamentalmente en cEEs, localizadas alrededor de los glomérulos. La colecistoquinina también es un excelente marcador de células empenachadas, pero, en este caso, se expresa especialmente en células empenachadas situadas en la CPE, principalmente en aquellas situadas en la parte superficial de la capa, cerca del límite con la CGL. En esta localización se identifican como positivas tanto cES como cEM, aunque la colecistoquinina también pone de manifiesto una importante población de cEP, localizadas en las proximidades de la CCM.

Nuestros estudios de colocalización de neuronas positivas a mGluR1a con estos marcadores han demostrado un grado moderado de coexpresión de mGluR1a-neurocalcina. Aproximadamente un 30% de las cEEs mGluR1a-positivas coexpresan también neurocalcina. Pero no toda la población de cEEs NC-positivas, expresan el mGluR1a, ni todas las células mGluR1a-positivas a nivel glomerular se ponen de manifiesto con neurocalcina y por tanto éstas no son cEEs, sino cPGs (fig. 73).

Tras ausencia de estimulación olfatoria, la expresión de neurocalcina sufre una ligera reducción en la población de cEEs, a la par que aumenta la población de mGluR1a-positivas. Por ello, como podemos apreciar en la figura 74, la tasa de colocalización se reduce ligeramente, en paralelo a la reducción de expresión de la NC tras deprivación (fig. 74). De manera que, dado el aumento de elementos mGluR1a-positivos, podemos sugerir que las cEEs mGluR1a/NC-positivas forman parte de la población de células yuxtglomerulares mGluR1a-positivas del bulbo olfatorio en condiciones control, pero no contribuyen al aumento de esta población en condiciones de deprivación.

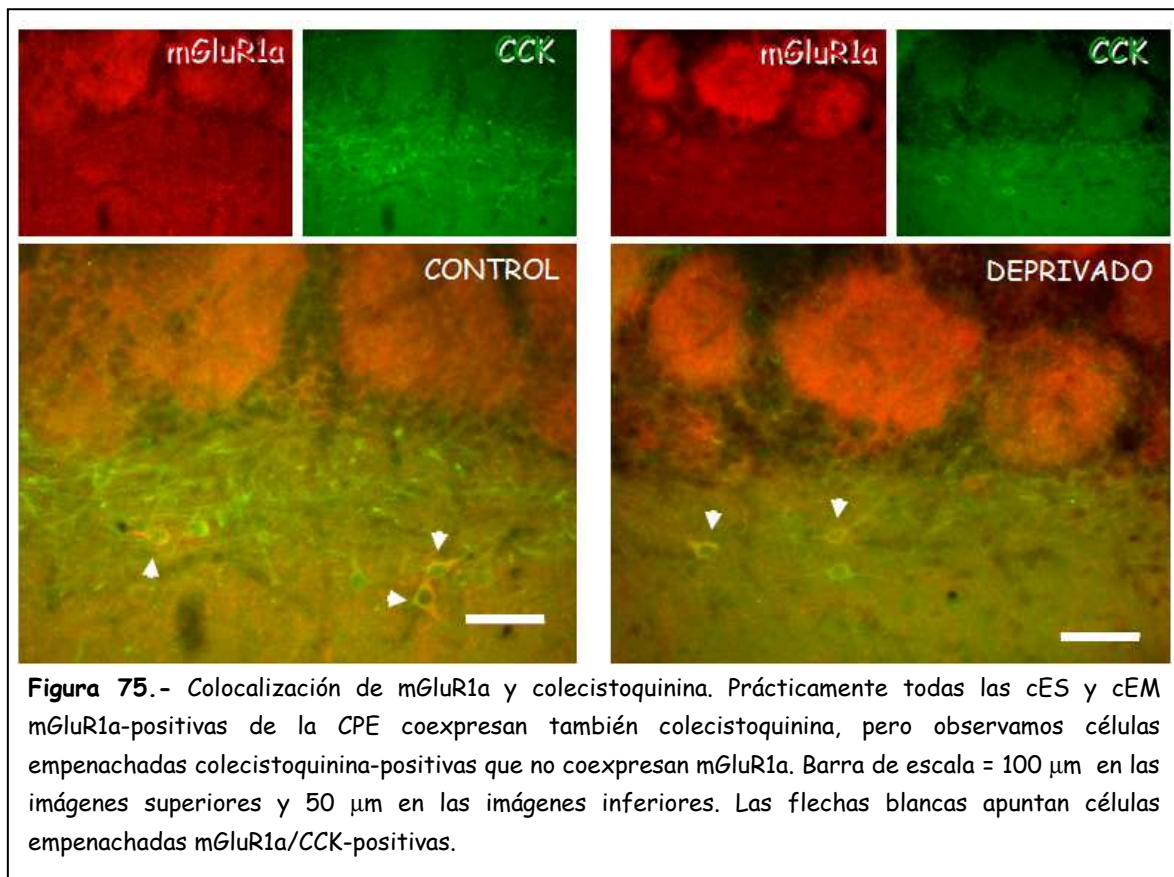


Algo similar ocurre con respecto a la colecistoquinina, con la que se encontró un moderado grado de coexpresión, fundamentalmente en la región superficial de la EPL, y que se correspondía con cES y cEM. Rara vez detectamos coexpresión mGluR1a-colecistoquinina en células empenachadas profundas (fig. 75).

La expresión de colecistoquinina es moderadamente alta en la población de cESs y cEMs, al igual que su tasa de colocalización con el mGluR1a. Prácticamente toda la población de cESs y cEMs mGluR1a-positivas son también positivas a colecistoquinina, pero no todas las colecistoquinina-positivas coexpresan mGluR1a (fig. 75).

En condiciones de privación olfatoria, la expresión de colecistoquinina se reduce mientras que la de mGluR1a se incrementa y, como consecuencia, la tasa de colocalización mGluR1a-colecistoquinina se reduce discretamente.

A la vista de estos resultados, podemos afirmar que la mayor parte de las células empenachadas mGluR1a-positivas constituyen una población de células empenachadas glutamatoceptivas/glutamatergicas que se solapa parcialmente con las dos grandes poblaciones de estas células descritas hasta el momento y definidas por la expresión de neurocalcina y colecistoquinina.



En ausencia de estimulación olfatoria tanto la expresión de neurocalcina como la de colecistoquinina se reducen moderadamente, mientras que el inmunomarcaje para

mGluR1a incrementa. Por ello la proporción de células mGluR1a-positivas que coexpresan ambos marcadores se reduce en términos relativos.

## **RESUMEN DE LA CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DE LAS NEURONAS POSITIVAS A mGluR1a Y EFECTO DE LA DEPRIVACIÓN SENSORIAL**

Como se ha descrito anteriormente, los efectos de la privación sobre la expresión de mGluR1a consisten básicamente en un incremento en la intensidad del inmunomarcaje en todas las capas, que se acompaña de una redistribución del receptor dirigido fundamentalmente a los dominios dendríticos. A esto se le añade un aumento en el número de células inmunopositivas, fundamentalmente en la población de células yuxtglomerulares y en las células horizontales de la CPI.

A pesar de este incremento en el número de células inmunopositivas para mGluR1a, el patrón general de coexpresión con los marcadores investigados no cambia en absoluto. Es decir, se mantiene la ausencia de coexpresión de mGluR1a con tirosina hidroxilasa, calbindina D-28k y calretinina e igualmente se detecta un porcentaje de coexpresión equiparable a las condiciones control con neurocalcina y colecistoquinina.

Llamativamente, sin embargo, el aumento de neuronas yuxtglomerulares positivas a mGluR1a no provoca una reducción en la tasa de coexpresión con VGLUT2, sino que ésta se mantiene en prácticamente la totalidad de las células marcadas. Dicho de otro modo, el aumento en el número de elementos positivos a mGluR1a se acompaña de un aumento en el número de elementos positivos a VGLUT2, y que el aumento en la expresión de ambos marcadores tiene lugar en las mismas neuronas, de manera que ambos marcadores se comportan del mismo modo como consecuencia de la ausencia de estimulación olfatoria.

## ANÁLISIS PROTEICO DEL mGluR1a POR ELECTROFORESIS-WESTERN-BLOTTING

Una vez conocidas la expresión y localización del mGluR1a *in situ*, caracterizados e identificados los elementos que lo expresan, y estudiado el efecto que la privación olfatoria tiene sobre su expresión, pasamos a completar la caracterización del receptor a nivel proteómico. Procedimos al análisis mediante electroforesis-Western-blotting, ya que esta técnica permite detectar simultáneamente la cantidad relativa y el estado de una proteína presente en un tejido. Para este estudio hemos considerado los siguientes planteamientos:

-en primer lugar, este análisis proteico nos ofrece la posibilidad de valorar cuantitativamente la expresión de mGluR1a. Así, corroboramos, en términos cuantitativos, el incremento de expresión del receptor que apuntan los resultados del estudio inmunohistoquímico.

-en segundo lugar, teniendo en cuenta que el mGluR1a puede aparecer como monómero, que no es funcional, o como dímero, que es la conformación activa (Romano y cols., 1996a), mediante este análisis determinaremos cuál de los estados de agregación es predominante en condiciones control y si éste patrón se ve modificado tras la privación sensorial.

### CONSIDERACIONES TÉCNICAS DEL ANÁLISIS PROTEICO

La idea de la dimerización en los receptores acoplados a proteínas G no ganó adeptos hasta finales de la década de los 90, rompiendo con el dogma tradicional de la estequiometría 1:1:1 receptor: proteína G: efector (Maggio y cols., 1993; Hebert y cols., 1996; Bai y cols., 1998; Bouvier, 2001). El mGluR1a fue uno de los primeros receptores donde se caracterizó esta dimerización. De hecho los mGluRs del grupo I fueron considerados durante algún tiempo los únicos receptores acoplados a proteínas G que existían como dímeros (Romano y cols., 1996a). La importancia de la dimerización de estos receptores radica en que determina su actividad o funcionalidad. La dimerización del mGluR1a está mediada principalmente por

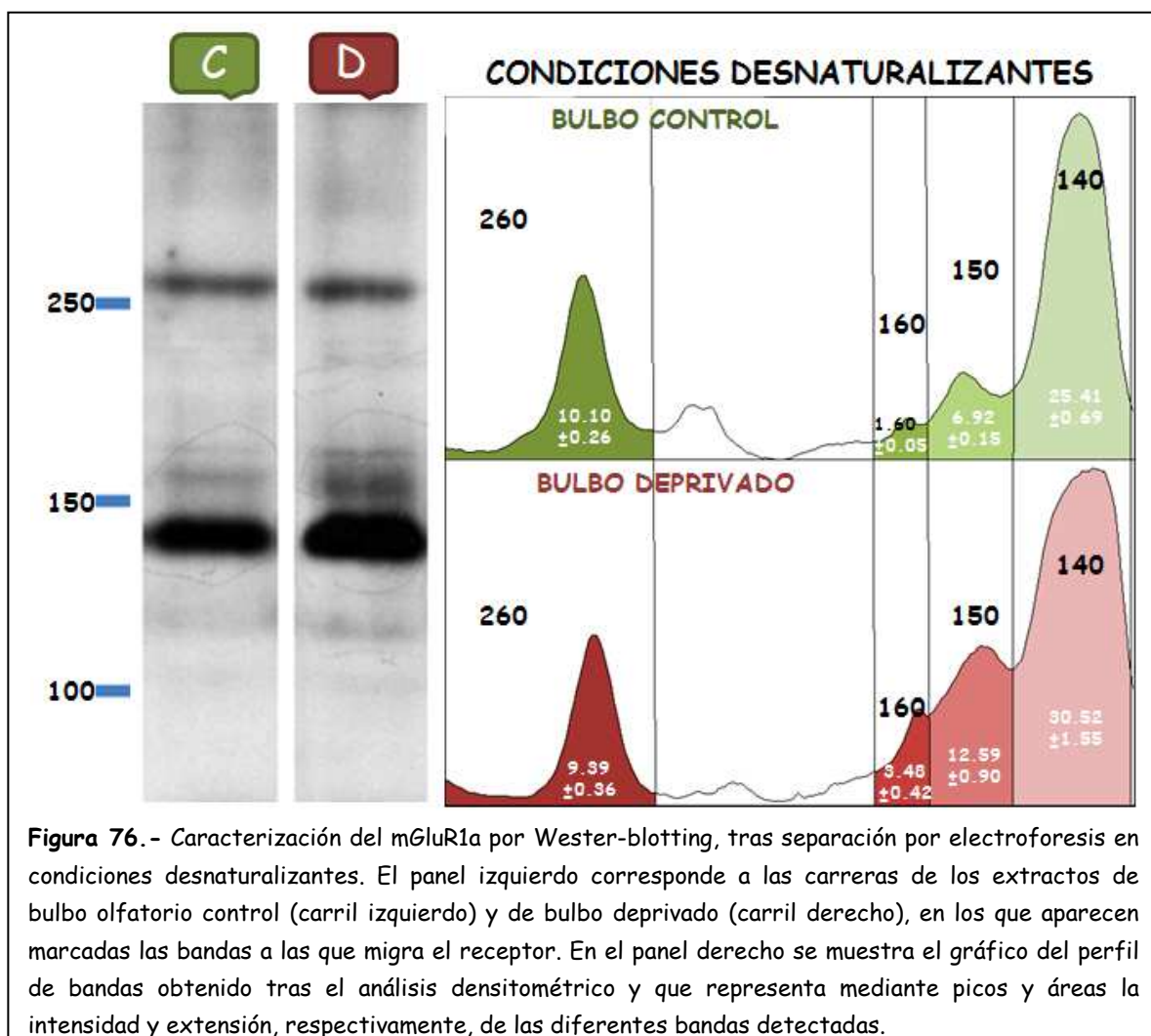
interacciones covalentes a través de puentes disulfuro que se establecen en regiones del extremo amino-terminal de los dominios extracelulares (Romano y cols., 1996a). Esta dimerización es destruida por la acción de los agentes reductores como el DTT (ditiotreitól) y el BME ( $\beta$ -mercaptoetanol) (usados comúnmente en las técnicas de SDS-PAGE), que rompen los puentes disulfuro de las cadenas polipeptídicas y, como consecuencia, tienden a separar las subunidades de los complejos oligoméricos, por lo que no serían apropiados si se pretende el estudio de estos complejos. Para este propósito, en este estudio, además de utilizar el modelo tradicional de SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes, hemos realizado ensayos electroforéticos en condiciones nativas/no-reductoras.

Hemos de tener en cuenta la dificultad que conlleva el estudio de proteínas con varios dominios transmembrana y las condiciones fisicoquímicas experimentales que hay que mantener para conseguir la detección de conformaciones proteicas oligoméricas. Por ello, el estudio proteico del mGluR1a en condiciones nativas lo hemos realizado siguiendo las modificaciones del protocolo descrito por Marzoa y colaboradores (2009), que se basa en variantes descritas por otros autores (Hooker y cols., 2007; Speers y Wu, 2007) quienes proponen las condiciones más adecuadas para la realización de estudios en los que se analizan complejos proteicos de membrana. En este sentido, las modificaciones básicas del método consisten en realizar la extracción de proteínas de la muestra utilizando un detergente (Triton X-100), menos agresivo que el habitual SDS, evitando así la pérdida de los grandes complejos proteicos de membrana. Debido a la propia naturaleza de las proteínas de membrana, como es el caso del mGluR1a, no es recomendable el uso de detergentes iónicos como el SDS en la extracción proteica, pese a que por su carácter fuertemente desnaturizante el SDS es el detergente más habitual en estudios proteómicos. Para la solubilización de proteínas de membrana en condiciones nativas, los detergentes más apropiados son los no-iónicos, como el Triton X-100, por su moderado potencial de alteración de la membrana y por ser un agente "desnaturizante suave". Por otra parte, otra de las modificaciones consiste en evitar el uso de agentes reductores como el DTT o el BME en el procedimiento electroforético, facilitando así la posible

detección de las especies diméricas del mGluR1a (Kashino, 2003; Speers y Wu, 2007; Marzoa y cols., 2009).

## ANÁLISIS PROTEICO EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Inicialmente realizamos el estudio proteómico en condiciones desnaturalizantes estándar. Tras la electroforesis SDS-PAGE y el Western-blotting observamos que el mGluR1a se distribuye en cuatro bandas de diferentes pesos moleculares, aproximadamente 140, 150, 160 y 260 kDa (fig. 76). Si tenemos en cuenta todo el producto inmunorreactivo detectado, el cálculo densitométrico del conjunto de bandas revela que en el bulbo deprivado la expresión del mGluR1a ( $55,98 \pm 2,12$ ) aumenta en un 11,95% con respecto al bulbo control ( $44,03 \pm 0,84$ ) (medido como el porcentaje de área ocupada por las bandas, equivalente al porcentaje de píxeles con un valor de gris superior al del *background*,  $\pm$  error estándar de la media, SEM).





Así, el análisis proteico del mGluR1a en los extractos celulares de bulbos olfatorios, controles y deprivados, confirma los resultados obtenidos inmunohistoquímicamente, ya que en el bulbo deprivado detectamos una mayor expresión del mGluR1a. Esto indica que la ausencia de estimulación olfatoria aferente provoca una regulación positiva de la síntesis del receptor (fig. 76).

**Banda de 140 kDa:** Coincidiendo con estudios previos (Romano y cols., 1996a, b; Hermans y cols., 1998a, b; Copani y cols., 2000) el receptor migra mayoritariamente, en estas condiciones, a la posición de 140 kDa aproximadamente, que corresponde al peso molecular deducido en función de la secuencia de aminoácidos para el mGluR1a-monómero (133,236 kDa según la base de datos UniProt). Esta banda es detectada tanto en los carriles cargados con el extracto de bulbo control (a partir de ahora "carril-control") como en los de los bulbos deprivados ("carril-deprivado"), pero siempre es más intensa en los carriles-deprivados, resultando en un aumento de expresión de la forma monomérica del 5,11% con respecto a la banda de monómero del bulbo control (fig. 76). Esto significaría prácticamente un aumento del 50% ya que este 5,11% está referido al 11,95% de aumento total.

**Bandas de 150 y 160 kDa:** Tanto en las carreras de bulbo control como de bulbo deprivado observamos que, una pequeña parte del producto que reacciona con el anticuerpo, se localiza por encima de la banda que corresponde al mGluR1a-monómero, y migra formando dos bandas, una aproximadamente a 150 kDa y la otra a 160 kDa. Estas bandas son más débiles y difusas que la que corresponde a la especie monomérica del receptor, pero al igual que ocurre en el caso del monómero, ambas presentan mayor intensidad en los carriles-deprivados en comparación con las bandas equivalentes de los carriles-control. El análisis indica que se produce un incremento de densidad del 5,67% en el caso de la banda de 150 kDa y del 1,88% para la banda de 160 kDa (fig. 76).

Varios indicios nos llevan a suponer que la banda de 150 kDa corresponde a una forma monomérica del mGluR1a sobrecargada por modificaciones postraduccionales como la fosforilación o la glicosilación. Por un lado no hemos utilizado glicosidasas en

la preparación de la muestra, y por otro lado, una banda de las mismas características ha sido descrita por Romano y colaboradores (1996a) para el mGluR5.

La banda que aparece con un peso molecular de 160 kDa puede ser atribuida a una comigración de la forma monomérica del receptor unida a otra proteína, probablemente alguno de sus ligandos intracelulares de la densidad postsináptica. Uno de los posibles candidatos responsables de la migración del receptor a la banda de los 160 kDa son las proteínas adaptadoras Homer cuyos pesos moleculares están entre 20-40 kDa dependiendo de la isoforma. Estas interpretaciones serán desarrolladas más adelante, en el apartado "discusión". En cualquier caso, lo que sí queda claro es que en la migración a las bandas de 150 y 160 kDa está implicada la conformación monomérica del mGluR1a y por tanto no representan formas activas del receptor.

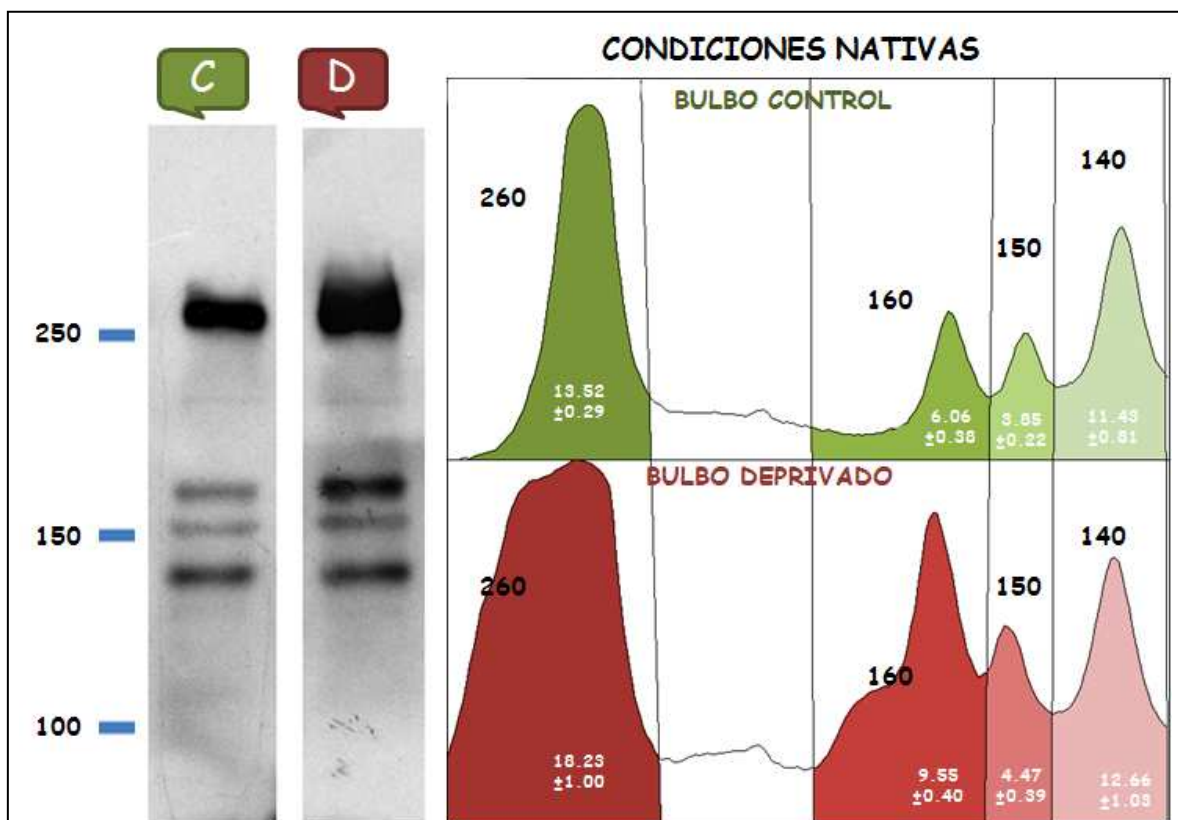
**Banda de 260 kDa:** Por último, detectamos otra banda de menor migración que se detiene aproximadamente a nivel de los 260-270 kDa y que es atribuible a la especie dimérica del mGluR1a. Probablemente, además, este peso molecular corresponda más concretamente al dímero glicosilado ya que el radio de Stokes en los complejos oligoméricos se reduce y compacta la estructura proteica, lo que disminuye la aparente masa molecular, por lo que no descartamos que la banda de 260-270 kDa pueda ser atribuida al dímero glicosilado.

A primera vista en las carreras no se aprecian diferencias en cuanto a densidad y extensión de esta banda entre carril-deprivado y carril-control. De hecho, cuantitativamente, el análisis muestra una sutil reducción del 0,71% en la expresión de la forma dimérica del mGluR1a en los carriles-deprivados comparado con los carriles-control (fig. 76).

## **ANÁLISIS PROTEICO EN CONDICIONES NATIVAS**

Como se comentó con anterioridad, llevamos también a cabo el estudio proteómico modificando las condiciones de extracción y de electroforesis para preservar el receptor en sus condiciones nativas. En este sentido se introdujeron variaciones en estos procesos para preservar, en lo posible, la forma dimérica del receptor y poder determinar, al menos de forma aproximada, la tasa de receptor activo.

En estas condiciones, y como era de esperar, la comparación conjunta de todas las bandas detectadas entre carriles-control y carriles-deprivados demuestra que la privación olfatoria conduce a un aumento de expresión del receptor mGluR1a, volviendo a corroborar una vez más los resultados obtenidos anteriormente en el análisis en condiciones desnaturalizantes y en el estudio inmunohistoquímico. En condiciones nativas el aumento de expresión del receptor es traducido como un 10,05% más de densidad óptica en el bulbo deprivado ( $44,91 \pm 2,72$ ) que en el bulbo control ( $34,86 \pm 3,79$ ) (fig. 77). Este incremento es mucho más aparente en las bandas de mayor peso molecular, 260 y 160 kDa, que en las dos bandas de mayor migración (150 y 140 kDa), donde se reflejan diferencias más moderadas entre el bulbo control y el bulbo deprivado (fig. 77).



**Figura 77.** - Caracterización del mGluR1a por Wester-blotting, tras separación por electroforesis en condiciones nativas. El panel izquierdo corresponde a las carreras de los extractos de bulbo olfatorio control (carril izquierdo) y de bulbo deprivado (carril derecho), en los que aparecen marcadas las bandas a las que migra el receptor. El panel derecho corresponde al gráfico del "perfil de bandas" obtenido tras el análisis informático, donde la intensidad de las bandas está representada por picos y la densidad óptica de las diferentes bandas detectadas está representada como el área del pico correspondiente.

**Banda de 140 kDa:** Como muestran las imágenes representativas de los geles, la banda que migra a los 140 kDa, que corresponde a la forma monomérica del mGluR1a, manifiesta una intensidad similar tanto en el carril-control como en el carril-deprivado. Comprobamos por densitometría que en los carriles-deprivados la expresión del mGluR1a-monómero aumenta un 1,23% en comparación con los carriles-control, por lo que no se puede considerar demasiado responsable del incremento general de expresión del mGluR1a en condiciones de privación olfatoria (fig. 77). De hecho, según nuestros resultados, podemos inferir que la fracción monomérica del mGluR1a es una de las que contribuye en menor medida contribuye al aumento de expresión que se produce en ausencia de estimulación olfatoria (fig. 77).

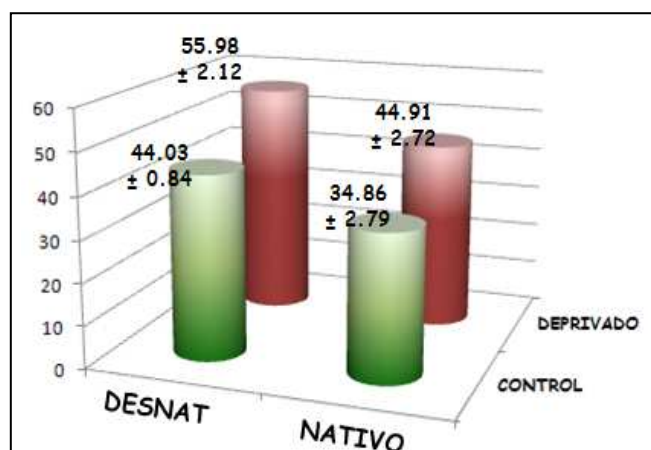
**Bandas de 150 y 160 kDa:** De forma similar a lo que ocurre en el caso del monómero-mGluR1a, la expresión de la especie proteica que se detiene en el peso molecular correspondiente a de 150 kDa apenas muestra diferencia entre carriles, sin detectarse grandes diferencias entre el bulbo control y el bulbo deprivado. El análisis detecta sólo un ligero incremento de un 0,62 % del producto depositado en la banda de los 150 kDa en los carriles-deprivados frente a los carriles-control. De manera que podemos afirmar que la privación olfatoria apenas afecta a la expresión de esta especie proteica, ni a la expresión de monómeros-mGluR1a (fig. 77).

Sin embargo, es evidente el aumento de intensidad de la banda del 160 kDa en los carriles-deprivados al compararlos con la misma banda en los carriles-control. En este caso la especie proteica que se detiene en la banda de los 160 kDa en el bulbo deprivado aumenta en un 3,49% con respecto al control. Si tenemos en cuenta que este incremento representa aproximadamente un tercio del incremento global (3,49% de un total de 10,05%) que se produce en la expresión del mGluR1a en el bulbo deprivado, podemos entonces considerar que esta especie proteica es responsable al menos en un 30% de la modificación de la expresión del receptor (fig. 77).

**Banda de 260 kDa:** Como se aprecia en la imagen de las membranas (fig. 77), tanto en los carriles-control como en los carriles-deprivados la mayor parte del receptor se expresa en forma de dímeros, en comparación con la forma monomérica. Queda claro que, en condiciones nativas, los complejos diméricos son la especie

proteica más abundante. Si la comparación de la banda de 260 kDa la realizamos entre bulbos, no con la banda de monómero, observamos que la proporción de receptor que migra a esta banda de 260KDa en el carril-deprivado es mucho mayor a la que se detecta en el carril-control. Los resultados indican que en ausencia de estimulación olfatoria la expresión de la forma activa del receptor aumenta un 4,71% con respecto a la expresión del mGluR1a-dímero detectada en el bulbo control (fig. 77). De todas las especies proteicas detectadas, la forma dimérica es la que muestra un incremento más notable entre bulbo control y deprivado, aproximadamente un 50% (un 4,71% del 10,05%). Entonces podemos afirmar que es la forma proteica que más contribuye al aumento de expresión del mGluR1a que se produce en ausencia de estimulación olfatoria o, dicho de otra forma, es la conformación proteica del mGluR1a más afectada como consecuencia de la deprivación olfatoria. Pero además, este aumento tiene más significación si cabe, ya que ésta es la conformación activa del receptor, que corresponde a la forma dimérica anclada a membrana.

### CONDICIONES DESNATURALIZANTES vs NATIVAS



**Figura 78.**- Diagrama de barras de la comparación entre condiciones experimentales. Aunque el rendimiento es menor en condiciones nativas, la proporción en la que aumenta la expresión del receptor en el bulbo deprivado es similar en ambas condiciones. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del total de bandas que se detectan en los carriles correspondientes, n=8.

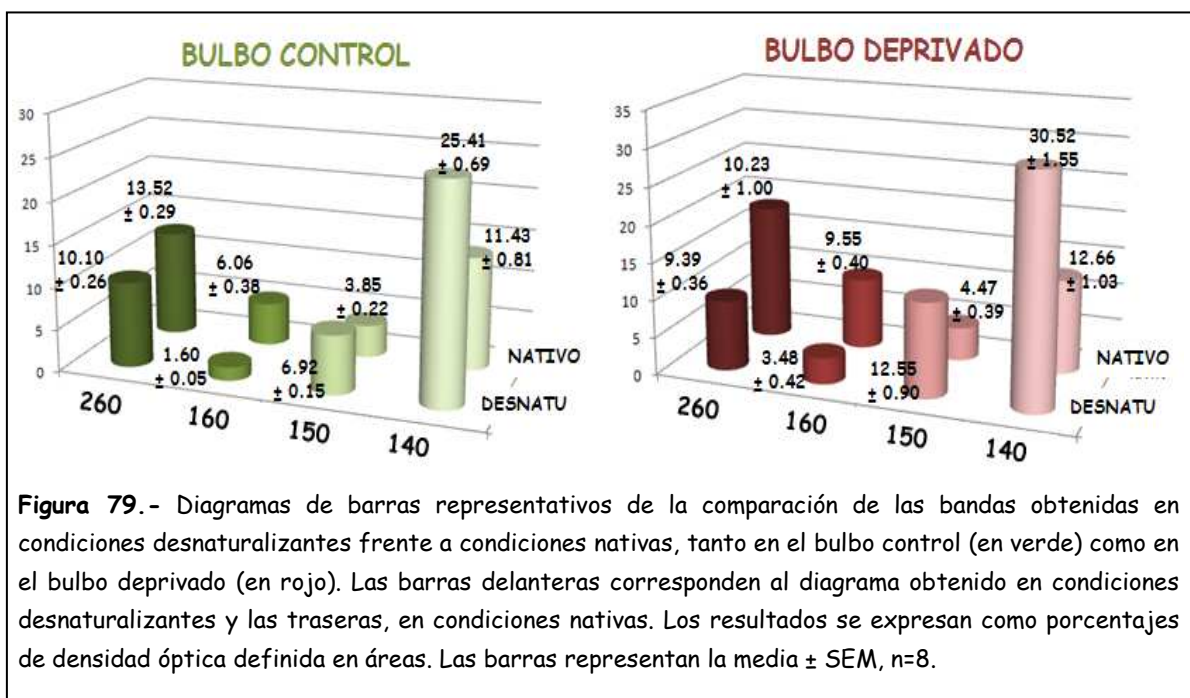
De acuerdo con nuestros resultados, el patrón de bandas correspondiente a la expresión de mGluR1a obtenido en condiciones desnaturalizantes es similar en cuanto a número y posición al obtenido en condiciones nativas, tanto en los bulbos controles como en los bulbos deprivados (ver figs. 76 y 77).

Como se muestra en el gráfico de la figura 78, en la que realizamos la comparación entre condiciones

desnaturalizantes y condiciones nativas, y teniendo en cuenta que partimos de la

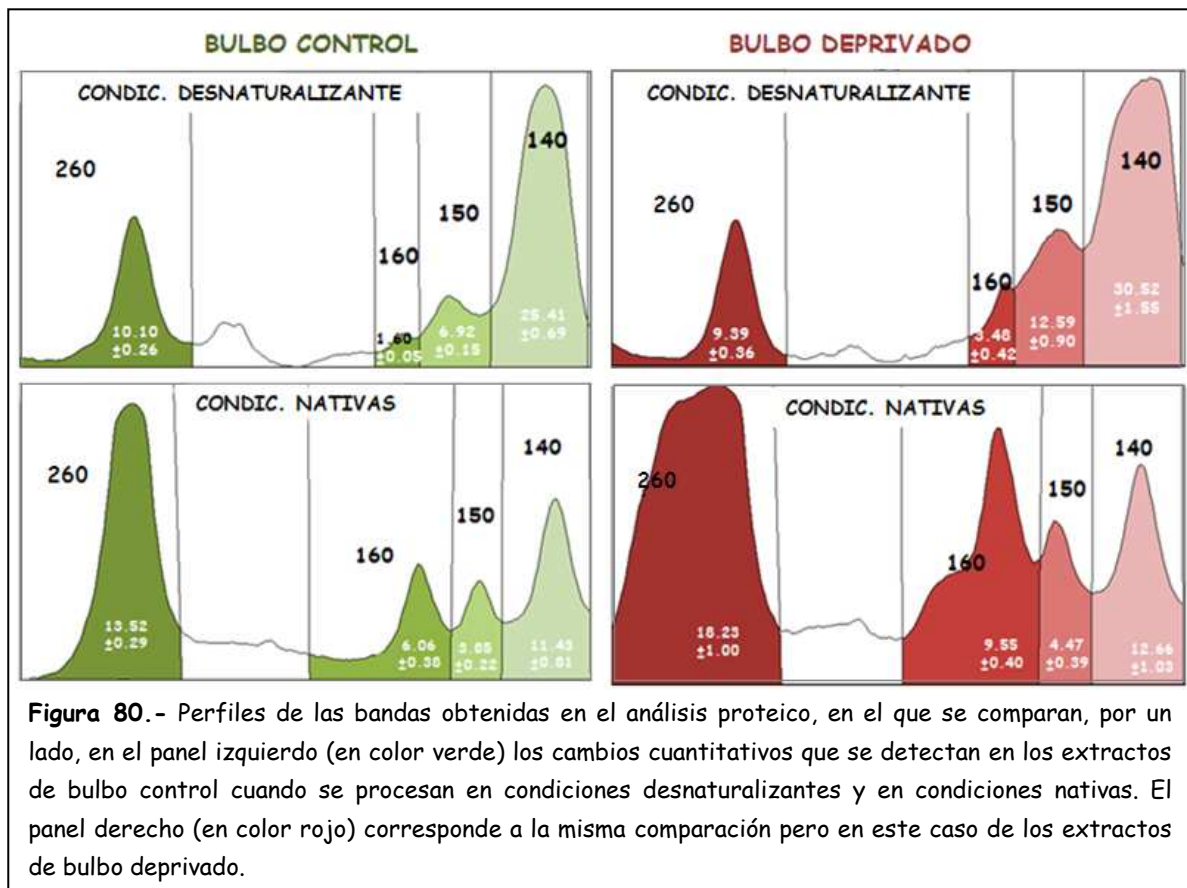
misma carga de extracto proteico en ambas condiciones, observamos que la cantidad de receptor, en términos generales, siempre es menor en condiciones nativas que en condiciones desnaturalizantes (fig. 78).

El rendimiento proteico de las condiciones nativas disminuye en aproximadamente un 1,26% con respecto a la metodología aplicada en condiciones desnaturalizantes. Pero, a pesar de este menor rendimiento obtenido en cuanto al total de proteína, lo más importante a destacar es que en ambas condiciones se corrobora el aumento de expresión del mGluR1a en el bulbo deprivado con respecto al bulbo control. Y además, este aumento, como cabe esperar, es similar en cuanto a proporción en ambas condiciones experimentales, siendo, en el primer caso del 11,95% y en condiciones nativas del 10,05%. Apoyándonos en estos resultados y en los del análisis inmunohistoquímico podemos confirmar que en ausencia de estimulación olfatoria el bulbo olfatorio dispara la síntesis del mGluR1a, superando en un 10-12% aproximadamente la actividad biosintética normal (fig. 78).



En cuanto a la diferente distribución de las bandas en una y otra condición, caben destacarse dos observaciones llamativas: por un lado, la forma monomérica del mGluR1a es siempre la especie predominante en condiciones desnaturalizantes, tanto

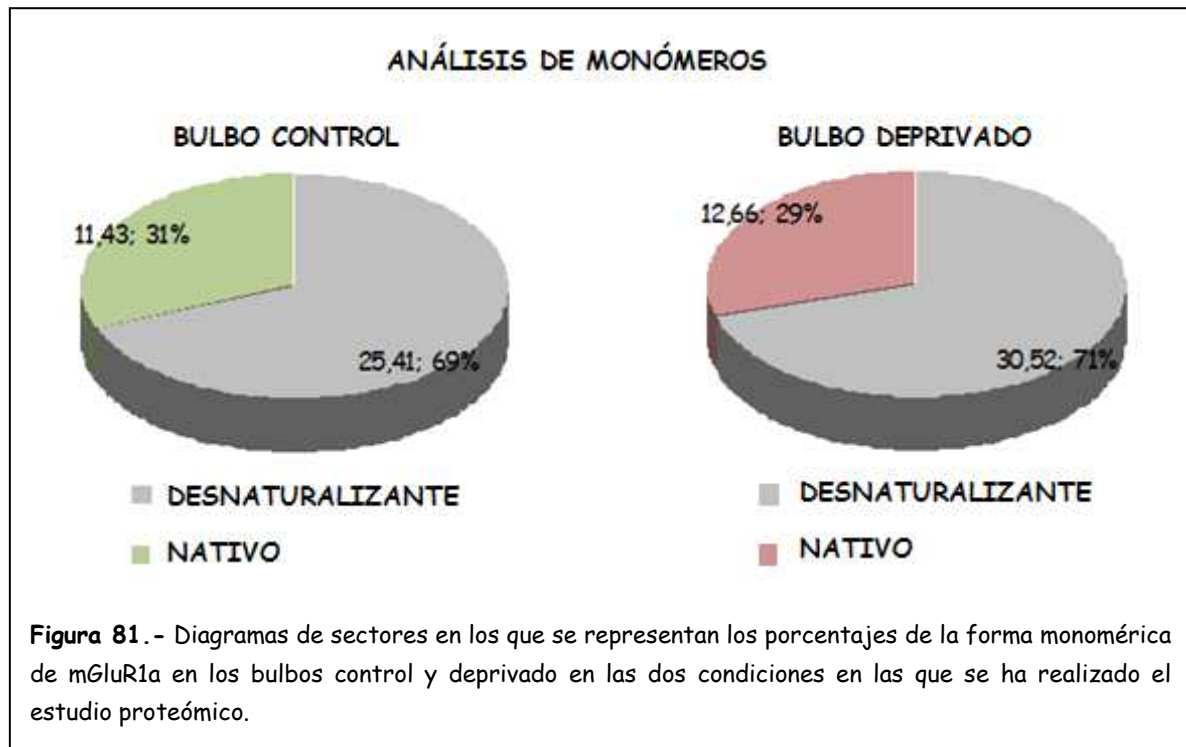
en el bulbo control como en el deprivado, al contrario de lo que ocurre en condiciones nativas, donde la mayor parte del receptor migra como dímero a la banda de los 260 kDa, especialmente en el bulbo deprivados (figs. 79 y 80). Por otro lado, en condiciones desnaturalizantes también detectamos forma dimérica y en condiciones nativas continúa apareciendo forma monomérica.



Una vez determinado el efecto global de las condiciones experimentales, analizamos cómo influyen estas condiciones sobre cada especie proteica. Las modificaciones más llamativas se producen en cuanto a la proporción en que aparecen las diferentes conformaciones del receptor en el patrón desnaturalizante y en el patrón nativo, comparando por separado bulbo control y bulbo deprivado (fig. 80).

**De la banda de 140KDa (forma monomérica de mGluR1a):** En el bulbo control, en condiciones nativas, detectamos aproximadamente la mitad de la forma monomérica ( $11,43 \pm 0,81$ ) del mGluR1a, que en condiciones desnaturalizantes

( $25,41 \pm 0,69$ ), es decir, una proporción de 1:0,44 (desnaturalizante vs nativo). De forma similar en el bulbo deprivado, la proporción de monómero detectada es aproximadamente 1:0.41 en condiciones desnaturalizantes ( $30,52 \pm 1,55$ ) vs condiciones nativas ( $12,66 \pm 1,03$ ) (fig.80 y 81). En resumen la aparición de la forma monomérica se reduce a algo más de la mitad en condiciones nativas en ambos bulbos con respecto a las condiciones desnaturalizantes.



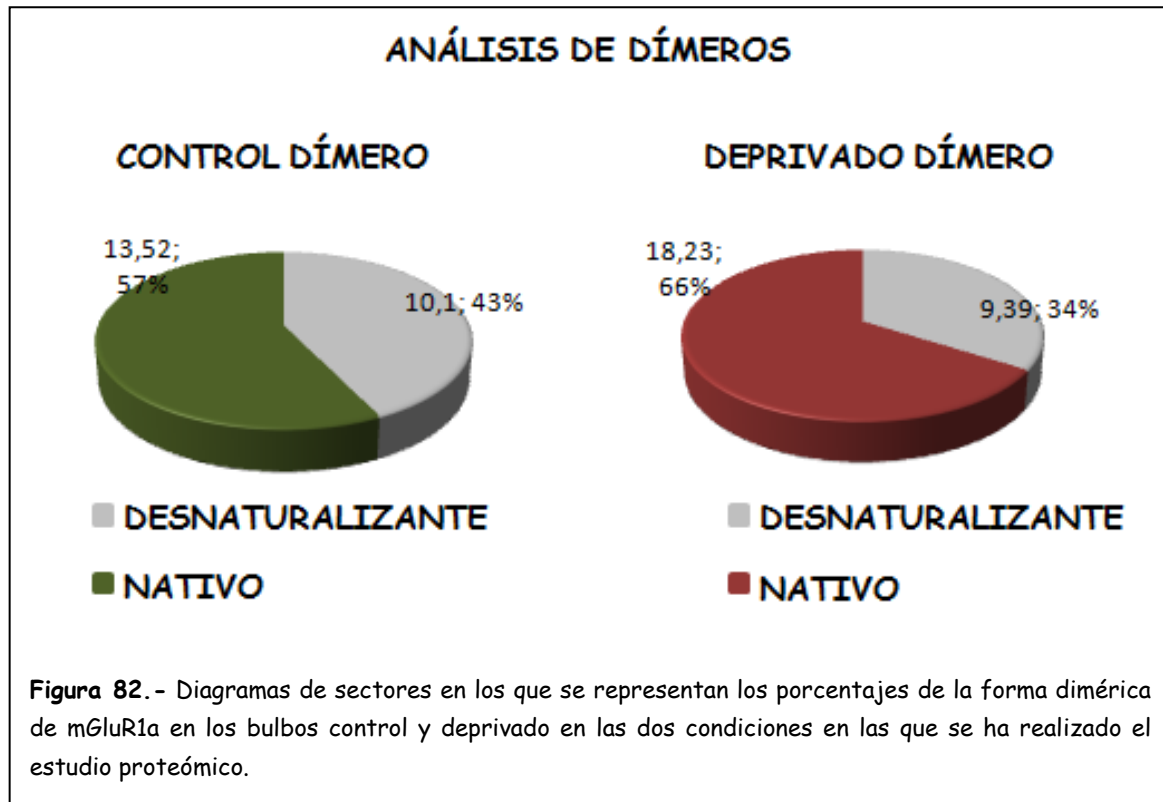
Esta fracción de monómero-mGluR1a mantiene su migración a la banda de los 140 KDa incluso en condiciones nativas, es decir, en ausencia de agente reductor y, tras una solubilización suave, siguen comportándose como monómero sin acomplejarse. Todo indica que esta fracción, que en el bulbo control representa un 11,43%, corresponde al *pool* de monómero-mGluR1a intracelular existente en la célula antes de su procesamiento posterior. Además, como podemos observar, esta fracción es equivalente a la detectada en el bulbo deprivado (12,66%), de manera que podemos asumir que el *pool* basal de monómeros del mGluR1a se mantiene de forma similar en ausencia de estimulación olfatoria ya que la deprivación olfatoria apenas modifica esta fracción en un 1,23% del 10,05% total del incremento de expresión detectado en conjunto.



**De la banda de 260 kDa (forma dimérica de mGluR1a):** En cuanto al complejo dimérico, como cabe esperar, en condiciones nativas siempre es mayor la proporción de dímeros-mGluR1a en ambos bulbos y, teniendo en cuenta el descenso de monómeros comentando anteriormente, podría decirse que el detrimento de los monómeros implica el aumento de los dímeros. En el bulbo control el incremento de dímeros entre condiciones desnaturalizantes y nativas es de 1:1,33, y en el bulbo privado la proporción en que aumenta la forma dimérica es de casi el doble, concretamente de 1:1,90 (desnaturalizante vs nativo) (fig. 82). Queda claro que este aumento de la forma activa del receptor, el dímero-mGluR1a, procede de parte de la fracción monomérica que se detecta en condiciones desnaturalizantes susceptible de desacomplejarse por las condiciones experimentales y que en condiciones nativas migra como especie acomplejada. Pero, por otro lado, también hay que tener en cuenta que ya en condiciones desnaturalizantes aparece una fracción dimérica que no es susceptible de desacomplejarse ni siquiera en presencia del agente reductor y tras una fuerte solubilización, es decir no partimos de cero dímeros en condiciones desnaturalizantes, de hecho hablamos de aumento de dímeros y no de aparición *de novo* de los dímeros.

De manera que según nuestros resultados, y a diferencia de algunas interpretaciones previas (Romano y cols, 1996a), existe una fracción de receptor que aún se comporta como dímero en presencia de agente reductor, indicando que los puentes disulfuro no son responsables cien por cien de mantener esta conformación dimérica. Debido a la presencia de esta fracción dimérica, que es resistente a las condiciones de desnaturalización y a la ruptura de puentes disulfuro, asumimos que el proceso de dimerización del mGluR1a no depende exclusivamente de los puentes disulfuro, sino que también pueden intervenir otras interacciones que mantienen la conformación dimérica estable. A partir de ahora nos referiremos a esta fracción "dímeros-BME resistentes".

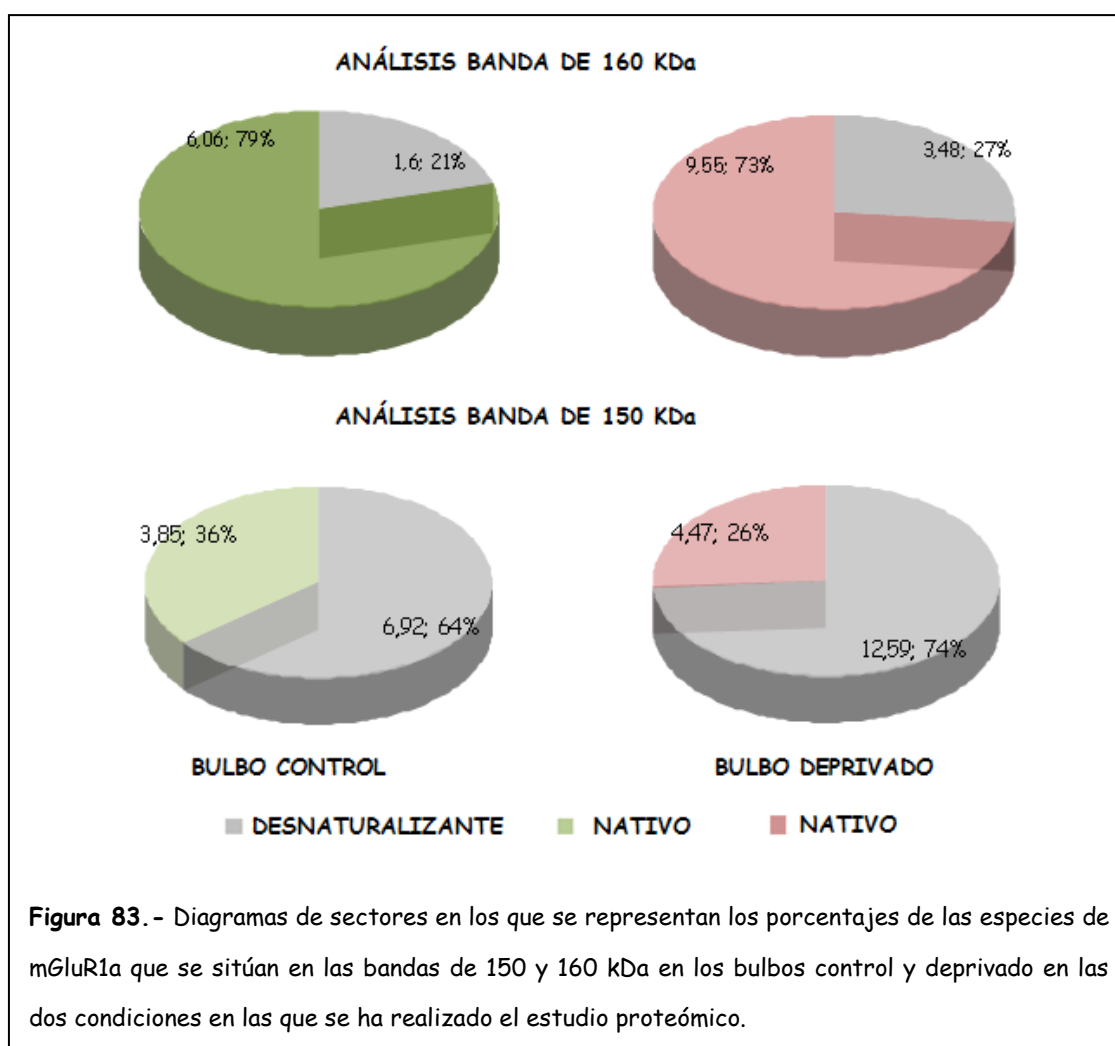
Pero además, esta fracción dimérica detectada en condiciones desnaturalizantes, es detectada en una proporción similar en ambos bulbos ( $10,10 \pm 0,26$  en bulbo control y  $9,39 \pm 0,36$  en bulbo deprivado), es decir, no queda afectada ni por las condiciones experimentales ni por la eliminación de estimulación olfatoria; es detectada independientemente de las manipulaciones realizadas en el propio animal o del procedimiento técnico de detección.



**Bandas de 150 y 160 KDa:** La detección de la especie proteica que migra a la banda de los 160 KDa se ve favorecida por las condiciones nativas en ambos bulbos. En el bulbo control esto se traduce como un aumento en proporciones 1:3,78 y en el bulbo deprivado en una proporción de 1:2,74 (desnaturalizante vs. nativo)

Asumimos que no toda la fracción de monómero, que aparecía en condiciones desnaturalizantes y que "desaparece" en condiciones nativas, migra exclusivamente a la banda del dímero, sino que también se desplaza a la banda de 160 KDa, contribuyendo así al aumento de esta especie proteica (fig.83). De forma similar a lo que ocurre en la expresión de la forma dimérica, esta fracción parece ser

dependiente de diferentes interacciones, unas susceptibles de ser eliminadas en condiciones desnaturalizantes, y otras resistentes a estas condiciones. Pero a diferencia de la forma dimérica resistente, en este caso la resistencia parece ser favorecida bajo condiciones de privación olfatoria, ya que detectamos un porcentaje mayor de esta conformación en los bulbos derivados (3,48%) frente a los bulbo control (1,60%).

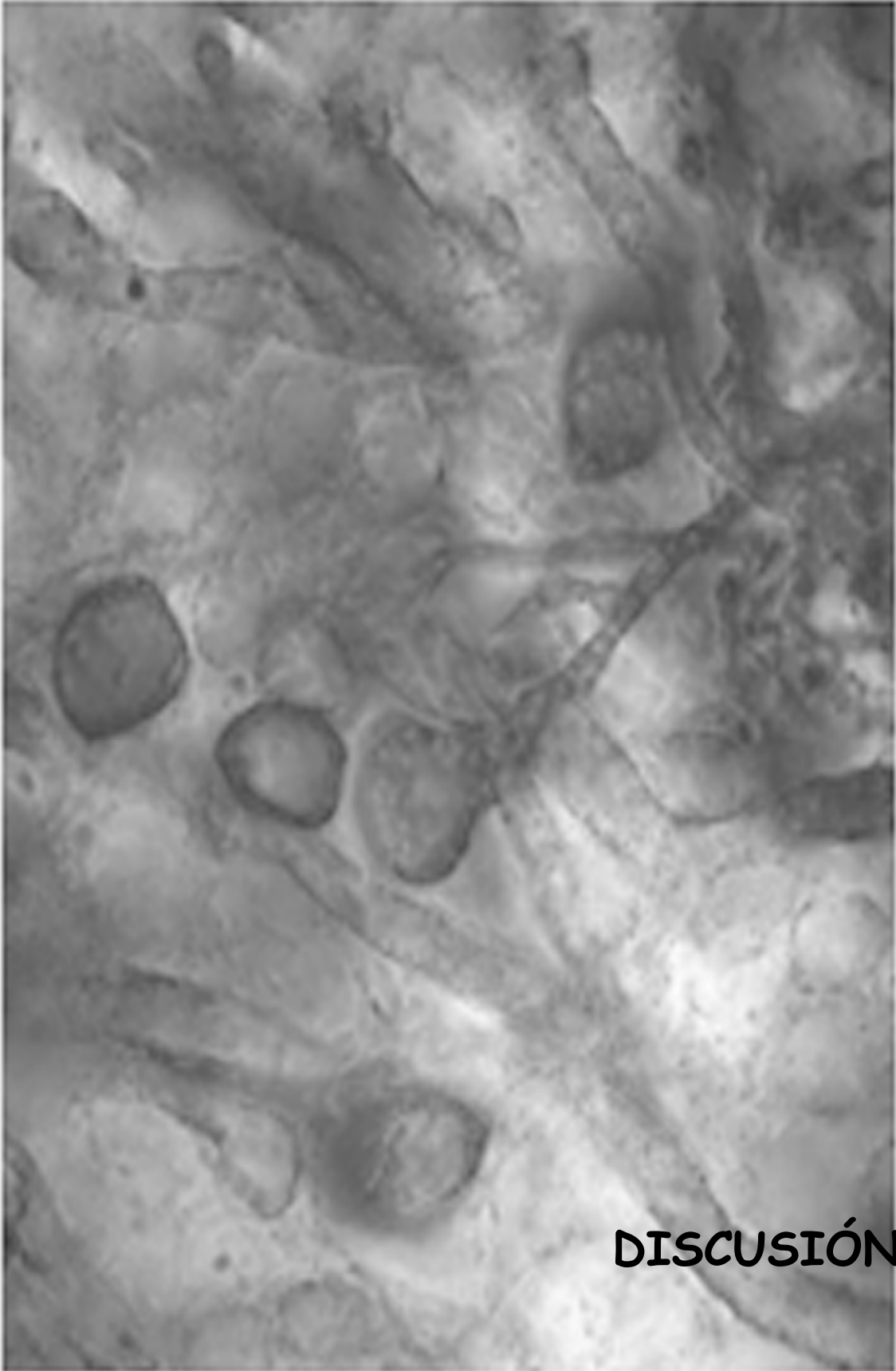


En el caso de la especie proteica que migra a la banda de los 150 kDa el efecto que ejercen las condiciones experimentales es semejante a lo que ocurre en el caso de la forma monomérica. Se produce un descenso de expresión proteica, que en el bulbo control es de 1:0,55 (desnaturalizante vs nativo) y de 1:0,35 en el bulbo deprivado.

## RESUMEN DEL ANÁLISIS PROTEICO DEL mGluR1a

A modo de resumen, como cabe esperar, las condiciones nativas desplazan la detección del mGluR1a hacia las formas de mayor peso molecular, principalmente a las bandas de 260 y 160 KDa. Esto nos da una idea de la expresión proteica más cercana a la existente en la célula, al verdadero entrono celular, teniendo en cuenta que las condiciones experimentales nativas respetan más el entorno de las membranas y la conformación de las proteínas.

El estudio inmunohistoquímico indicaba un aumento de síntesis del receptor, pero mediante esta técnica no somos capaces de determinar la tasa de la forma funcional del receptor. Es decir, mediante el estudio inmunohistoquímico podríamos estar detectando un incremento en la síntesis del receptor, pero que realmente no tuviera una traducción en cuanto a funcionalidad. Sin embargo, mediante el análisis proteómico hemos corroborado el aumento de expresión del receptor, pero, además, los resultados del estudio en condiciones nativas reflejan que este aumento de expresión del mGluR1a se debe mayoritariamente a un aumento del receptor en su conformación funcional, mientras que la fracción monomérica apenas tiene protagonismo en este aumento. Por otro lado, el análisis en condiciones desnaturizantes arroja evidencias de que la estabilidad de la conformación dimérica no sólo depende de la existencia de puentes disulfuro.



**DISCUSIÓN**

El presente trabajo de Tesis Doctoral ofrece una descripción detallada de los elementos que expresan el receptor mGluR1a en el bulbo olfatorio de la rata y aporta toda una serie de datos de relevancia sobre la modificación de su expresión en ausencia de estimulación sensorial olfatoria durante el desarrollo postnatal. La eliminación de la estimulación olfatoria en animales recién nacidos, provoca un incremento de la expresión de mGluR1a en el bulbo ipsilateral a la narina ocluida cuando se analiza en estado adulto. Éste es detectado en un número mayor de neuronas en aquellas poblaciones neuronales que previamente eran positivas a mGluR1a. Además, en los elementos que lo expresaban previamente, tiene lugar, junto con un incremento de la intensidad de la inmunotinción, una redistribución del receptor, de modo que en condiciones experimentales aparece localizado a lo largo de todo el dominio dendrítico y no tiene una distribución más restringida, tal como ocurre en condiciones control. Por otra parte, el estudio proteómico mediante electroforesis y Western-blotting nos ha permitido cuantificar el incremento de expresión del receptor, demostrando, además, cómo la forma dimérica del mismo, que constituye la forma funcional, es la que contribuye en mayor medida al incremento de la tasa de expresión del receptor detectada.

La correcta función del SNC depende de la capacidad de desarrollar fenómenos de plasticidad tanto durante el desarrollo como en respuesta a estados fisiológicos diferentes. Las alteraciones funcionales en la expresión de receptores de neurotransmisores son algunos de los mecanismos a través de los que se expresa la plasticidad. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que mGluR1a juega un papel fundamental para el ajuste de las alteraciones sufridas por las aferencias glutamatérgicas como consecuencia de la deprivación sensorial, y apoyan la participación de este receptor en los fenómenos básicos de plasticidad que tienen lugar en la primera estación de relevo de la vía olfatoria.

## **DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO**

### **POBLACIONES NEURONALES POSITIVAS A mGluR1a**

Nuestros resultados, en cuanto a la distribución del mGluR1a en las diferentes capas del bulbo olfatorio en condiciones control, son plenamente coincidentes con los ofrecidos en trabajos previos (Shigemoto y cols., 1992; Van den Pol, 1995; Petralia y cols., 1997; Sahara y cols, 2001). De modo general, el receptor se expresa fundamentalmente en las capas más externas del bulbo (a excepción de la CFNO que es completamente negativa): CGL, CPE, CCM y CPI. De esta distribución, podríamos extraer, a priori, la conclusión de que mGluR1a parece estar implicado en la transmisión glutamatérgica entre las aferencias primarias y las neuronas de proyección, así como en los elementos moduladores de la información sensorial a nivel glomerular (neuronas yuxtglomerulares). En este esquema, la única excepción la representarían los elementos que expresan el receptor en la CPI, que se situarían ya en localizaciones inframitrales (profundas). No obstante, aunque su localización en capas profundas del bulbo olfatorio invitaría a pensar en éstas como participantes en el sistema modulador profundo, como se discutirá más adelante, están más en relación con la circuitería del nivel glomerular.

### **mGluR1a en las neuronas de proyección**

Las neuronas de proyección del bulbo olfatorio, cM/Es, muestran una elevada expresión del receptor, tanto en el soma, como en gran parte de la extensión de sus ramas dendríticas. La localización dendrítica del receptor es lo que confiere la densa inmunotinción detectada, tanto en la CGL, como en toda la extensión de la CPE, capas donde se extienden fundamentalmente las dendritas de estas neuronas.

Respecto a las células mitrales, el hecho de que sus somas se sitúen formando una hilera monocelular, facilita notablemente su identificación, a la vez que nos permite asegurar que todas ellas demuestran expresión de mGluR1a. De este modo podemos afirmar que el receptor está implicado, de algún modo, en la recepción de las señales glutamatérgicas que reciben las principales neuronas de proyección del bulbo olfatorio.

En el caso de las células empenachadas nuestros resultados apuntan a que una moderada población de éstas presenta inmunoreactividad para mGluR1a, pero no parece que su totalidad, como ocurre con las células mitrales, sea positiva. Una de las dificultades encontradas a la hora de determinar este extremo es el hecho de que las secciones inmunomarcadas para mGluR1a mostraban un marcaje tan denso en la CPE que se hacía complicado individualizar los somas marcados del resto de neuropilo que les rodeaba. Mediante el estudio de secciones semifinas pudimos, sin embargo, comprobar la presencia de células empenachadas mGluR1a-positivas por toda la extensión de la CPE. Aunque sus somas aparecían distribuidos por toda la capa, se observaban con mayor frecuencia en la región superficial de la CPE, cerca del límite con la CGL, mientras que su presencia en las regiones profundas era más esporádica. Esta distribución de células empenachadas inmunoreactivas para mGluR1a no es sorprendente si tenemos en cuenta que la densidad de estas neuronas es notablemente mayor en la mitad superficial de la CPE que en la profunda (Liu y Shipley, 1994).

A la complejidad para determinar la tasa de expresión relativa del mGluR1a en la población de células empenachadas comentada con anterioridad, hay que añadir el hecho de que esta población neuronal ha sido dividida en diferentes subtipos en



función, principalmente, de su localización. Así, encontramos cEEs formando parte del grupo de neuronas yuxtglomerulares, alrededor de los glomérulos en la CGL, mientras que en la CPE se definen, adicionalmente, tres tipos más en función de su localización en posiciones superficiales de la capa hasta las más profundas y que se denominan: cESs, cEMs y cEPs. Éstas difieren entre sí, además, en tamaño y densidad del penacho dendrítico que introducen en el glomérulo, en la distancia a la que proyectan a centros superiores, en sus dianas y en el grado de respuesta a la estimulación eléctrica (Macrides y Schneider, 1982; Schoenfeld y cols., 1985; Bastianelli y cols., 1993; Liu y Shipley, 1994; Shipley y Ennis, 1996; Briñón y cols., 1998, 1999; Nagayama y cols., 2004). Las cESs aparecen en la parte más superficial de la CPE, en el límite con la CGL, mientras que las cEMs se localizan, desde la zona inmediatamente adyacente al lugar que ocupan las cESs, hasta la zona central de la capa, y las cEPs, que son menos numerosas, se distribuyen por la mitad profunda de la CPE, hasta el límite con la CCM (Macrides y Schneider., 1982; Shipley y Ennis, 1996).

En nuestras secciones detectamos perfiles positivos a mGluR1a, que identificamos como células empenachadas, tanto en la CGL como en la CPE. En esta última capa, los elementos inmunopositivos fueron detectadas en diferentes localizaciones a lo ancho de la capa, por lo que podemos asegurar que tiene lugar la expresión del receptor en representantes de todos los tipos de células empenachadas de la CPE, aunque los somas inmunomarcados eran más abundantes en la mitad superficial, mientras que eran observados más esporádicamente en la parte profunda de la capa, como se ha descrito con anterioridad. Esto indicaría que, de la población de células empenachadas de la CPE, los subtipos más abundantes, en cuanto a expresión de mGluR1a, serían las cES y cEM.

De acuerdo con lo descrito por Liu y Shipley (1994), gran parte de estos tipos celulares expresan colecistoquinina y forman parte del Sistema de Asociación Intrabulbar. Los axones de estos tipos de células empenachadas se extienden por la CPI hasta inervar las dendritas de cGRs en la CPI de la parte opuesta del mismo bulbo olfatorio (Liu y Shipley, 1994; Lodovichi y cols., 2003). Estas proyecciones son, además, recíprocas punto a punto, y son tan precisas que establecen un "mapa

intrabulbar" que permite a las dos mitades del bulbo coordinar las respuestas a odorantes específicos, ya que este sistema conecta regiones funcionalmente equivalentes del mismo bulbo (Cummings y Belluscio, 2008; 2010).

Esto constituye un importante dato en función de los diferentes circuitos en los que cada tipo de células empenachadas está implicado. De particular interés, en relación con nuestras observaciones, es la clasificación que se establece de acuerdo a sus regiones diana de proyección. Las cEPs y algunas de las cEMs inervan la corteza olfatoria primaria (Schoenfeld y cols., 1985), mientras que la mayoría de las cEEs y las cESs son interneuronas o están implicadas en conexiones intrabulbares o interbulbares (Schoenfeld y Macrides, 1984; Schoenfeld y cols., 1985, Liu y Shipley, 1994; Cummings y Belluscio, 2008, 2010). Sobre esta base, nuestros resultados sugieren que el mGluR1a está implicado en la transmisión glutamatérgica de las células empenachadas que intervienen tanto en circuitos intra como extrabulbares.

**CONCLUSIÓN:** el mGluR1a en el bulbo olfatorio interviene, tanto en la transmisión local a nivel de circuitos intrabulbares, como en las proyecciones de largo alcance a través de circuitos extrabulbares.

### **mGluR1a en las células yuxtglomerulares**

Respecto a la expresión de mGluR1a en la CGL, hemos detectado células mGluR1a-positivas con características morfológicas de dos de los tipos de neuronas yuxtglomerulares y que se corresponden con los descritos para cEEs y para cPGs, mientras que no tenemos evidencia de marcaje en cSACs. Mediante comparaciones de secciones procesadas inmunohistoquímicamente con otras teñidas con la técnica de Nissl podemos afirmar que el conjunto de células yuxtglomerulares positivas a mGluR1a representa alrededor del 15% del total de estas células.

Estudios previos describieron la CGL como una capa con un neuropilo muy marcado para mGluR1a. En alguno de estos trabajos, llamativamente, no se describe la presencia de somas neuronales positivos alrededor de los glomérulos (Sahara y cols., 2001) y en otro se habla de un escaso número de cPGs en esta región (Van den Pol, 1995). Sin embargo, en nuestras secciones es evidente la presencia de somas

neuronales marcados, junto con su región dendrítica proximal, que aparecen rodeando los glomérulos. Esta discrepancia resulta difícil de conciliar ya que el anticuerpo utilizado por nosotros y el utilizado por estos autores reconoce la misma secuencia del extremo carboxi-terminal del receptor. Por tanto, es posible que algunas diferencias metodológicas empleadas por estos autores, frente a las utilizadas por nosotros, pudieran afectar a la capacidad del anticuerpo para detectar la presencia del receptor.

A nivel ultraestructural, el compartimento glomerular ocupado por los axones de las NROs se distingue por su mayor densidad a los electrones, mientras que el compartimento dendrítico presenta una menor densidad (Pinching y Powell, 1971b; Gracia-Llanes y cols., 2010). En nuestro estudio hemos observado perfiles dendríticos positivos a mGluR1a postsinápticos a los terminales axónicos de las NROs. Estos perfiles postsinápticos, constituyentes de sinapsis asimétricas, se han identificado como ramas dendríticas apicales de cM/Es, tal como han apuntado otros estudios (Ferraguti y cols., 2008). La identificación, a nivel ultraestructural, de la identidad exacta de un determinado perfil dendrítico es complicada. En general, los perfiles pertenecientes a dendritas de cM/Es suelen ser de gran diámetro y de muy baja densidad a los electrones (Pinching and Powell, 1971b). Por su parte, los perfiles de células yuxtglomerulares, específicamente los de cPG, suelen ser identificables por la presencia de gémulas, estructuras de tamaño superior a espinas dendríticas y que contienen pares recíprocos de sinapsis, siendo elementos postsinápticos de una sinapsis asimétrica y, a su vez, elemento presináptico de una sinapsis simétrica asociada a la anterior (Pinching y Powell, 1971a, b). La presencia de estas gémulas en perfiles dendríticos de cPGs, sin embargo, se observan fundamentalmente en zonas en las que se establecen sinapsis dendrodendríticas entre cM/Es y cPGs, las cuales tienen lugar en el compartimento dendrítico, mientras que son escasas en el compartimento axonal (Kosaka y cols., 1998). En nuestro caso, la mayor parte de los elementos inmunopositivos a mGluR1a se localizan en el compartimento axonal, recibiendo sinapsis asimétricas por parte de los axones de las NROs, por lo que se hace complicado visualizar gémulas que nos permitieran identificar un determinado

perfil con el de células PGs. No obstante, el hecho de que a nivel de microscopía óptica observemos neuronas yuxtglomerulares inmunomarcadas para mGluR1a, y que presentan una evidente dendrita principal que se ramifica en el interior del glomérulo, es argumento suficiente para asegurar que parte de los perfiles dendríticos inmunopositivos que observamos a microscopía electrónica en el compartimento axonal pertenecen tanto a cM/Es como a células yuxtglomerulares.

Siendo este el caso, y teniendo en cuenta que entre las células yuxtglomerulares identificamos como mGluR1a-positivas tanto a cEEs como a cPGs, podemos afirmar que la población de cPGs que expresan el receptor, pertenece a las cPGs de tipo I de acuerdo a la clasificación desarrollada en función de la conectividad de éstas (Kosaka y cols., 1997, 1998). Es decir, son cPGs cuyas dendritas se arborizan fundamentalmente en el compartimento axonal de donde reciben directamente los *inputs* sensoriales por parte de los axones de las NROs.

**CONCLUSIÓN:** Los perfiles dendríticos inmunopositivos para mGluR1a que se localizan en el glomérulo como elementos postsinápticos a los axones de las NROs pertenecen tanto a neuronas de proyección, cM/Es, como a células periglomerulares de tipo I.

### **mGluR1a en otras poblaciones interneuronales**

En las capas inframitrales, concretamente en la CPI, nuestro estudio demuestra la presencia de células mGluR1a inmunopositivas de soma fusiforme y dendritas horizontales, orientadas paralelamente a la laminación bulbar.

Estudios clásicos, utilizando fundamentalmente los métodos de impregnación de Golgi (Schenider y Macrides, 1978; López-Mascaraque y cols., 1986) describieron los tipos interneuronales localizados en las capas inframitrales (CPI y CCG), en donde, además de las células grano, mayoritarias, se definieron otros tipos de interneuronas, denominadas, en conjunto, células profundas de axón corto (cPACs). Éstas fueron clasificadas en función de la morfología, tamaño y localización somática, el tamaño, distribución y orientación de sus dendritas y la presencia o ausencia de espinas, definiéndose cuatro subtipos de cPACs: células de Blanes, células de Golgi, células

verticales de Cajal y células horizontales. Posteriormente se describieron distintos tipos neuroquímicos entre ellas, de modo que se han identificado subpoblaciones positivas a VIP, neuropéptido Y, somatostatina, calbindina D-28k, parvalbúmina y neurocalcina, entre otras (Briñón y cols., 1992, 1999, 2001; Alonso y cols., 1998, 2001; Crespo y cols., 1999, 2000; Gracia-Llanes y cols., 2003; Kosaka y Kosaka, 2007). No obstante, el conjunto de todos estos tipos neuroquímicos de cPACs sólo representa una pequeña población del total.

Trabajos más recientes (Eyre y cols., 2008; 2009) han caracterizado la práctica totalidad de las cPACs mediante la identificación de la expresión de las subunidades Kv2.1, Kv3.1b, Kv4.3 de canales de K<sup>+</sup> regulados por voltaje y la expresión de la subunidad  $\alpha$ 1 del receptor GABA<sub>A</sub>. La combinación de inmunocitoquímica para estos marcadores junto con inyección intracelular de biocitina permitió, además, establecer cierta correspondencia entre las características inmunocitoquímicas y los lugares preferentes de inervación por parte de los axones de estas neuronas. Así, a pesar de su denominación, las cPACs presentan un axón de largo recorrido y muy ramificado, en función de cuya distribución se han descrito al menos 3 tipos de cPACs. Una población cuyo axón se extiende y ramifica columnarmente en la CPE, una segunda que tiene sus terminales axónicas confinadas a la CCG, mientras que la tercera, y que está compuesta, casi exclusivamente, por el subtipo de cPACs horizontales, proyecta su axón a la CGL, específicamente a la región glomerular (Eyre y cols., 2008; 2009).

Respecto a este último grupo neuronal, tras la inyección de biocitina y demostración de la extensión de su axón hasta los glomérulos, Eyre y colaboradores (2009) consiguieron caracterizarlo neuroquímicamente utilizando como marcador el mGluR1a, logrando poner de manifiesto la práctica totalidad de las cPACs que proyectan a la CGL. Estos mismos autores describen estas células como neuronas cuyos somas aparecen restringidos a la CPI y poseen dendritas orientadas paralelas a los límites de la capa, tal como aparecen en nuestras secciones. Por ello, asumimos que las células horizontales positivas a mGluR1a descritas en nuestro estudio se corresponden exactamente con este subtipo de cPACs que inerva específicamente la CGL.

**CONCLUSIÓN:** Las células horizontales mGluR1a-positivas que aparecen en la CPI constituyen un subtipo dentro de las cPACs caracterizado por la expresión del receptor mGluR1a y por poseer un axón que inerva específicamente la región glomerular.

Las cPACs, y por extensión estas células horizontales, se describieron clásicamente como neuronas que ejercían inhibición sobre las cGRs (Schneider y Macrides, 1978; Gall y cols., 1986), típicamente inhibitorias. Más recientemente se ha demostrado, mediante estudios ultraestructurales, que, al menos algunas subpoblaciones de cPACs, inervan selectivamente a otras poblaciones de cPACs, y no lo hacen sobre las cGRs (Crespo y cols., 2003). En cualquier caso, la importancia de las cPACs en la circuitería del bulbo olfatorio reside en que constituyen una red selectiva de interneuronas que modulan directamente a otras interneuronas, por lo que deben jugar un papel importante en el control de la circuitería bulbar y refuerza la importante contribución de otros tipos de interneuronas, distintas de células periglomerulares y células grano, como mediadoras en el procesado de la información olfatoria (Pressler y Strowbridge, 2006).

En el caso concreto de las células horizontales mGluR1a-positivas, su posición en la CPI, con sus dendritas extendiéndose paralelamente dentro de los límites de la capa, las erige como candidatas a recibir *inputs* glutamatérgicos por parte de los axones de las cM/Es, que se encuentran agrupados en esta misma capa. En este sentido, no sería descartable la participación de estas células horizontales en el Sistema de Asociación Intrabulbar descrito por Liu y Shipley (1994) al que hemos hecho referencia con anterioridad. Según este estudio, complementado por otros más recientes (Lodovichi y cols., 2003; Cummings and Belluscio, 2008; 2010), este sistema tiene su origen en proyecciones de cESs y cEMs (glutamatérgicas), cuyas dianas son dendritas de células grano, con las que contactan a nivel de la CPI, en regiones opuestas del mismo bulbo. Estas proyecciones, que son, además, recíprocas punto a punto, forman un sistema de conexiones intrabulbares muy precisas, poniendo en

contacto columnas bulbares isofuncionales, es decir, regiones bulbares que responden a los mismos odorantes, por lo que, a través de este sistema se refuerzan las respuestas a un determinado odorante por reclutamiento de columnas bulbares con la misma "afinidad" de odorante.

A pesar de que las dianas de las cES y cEM que integran este sistema se describen como dendritas de cGRs en la CPI, no sería descartable que parte de las dianas de esta proyección fueran las dendritas de las propias células horizontales que aparecen en esta capa como positivas a mGluR1a. En el caso de estas células horizontales, como en otros casos de cPACs, sus dianas se desconocen, por lo que cualquier interpretación sobre su contribución a los circuitos bulbares es meramente especulativa. No obstante, sus ramificaciones axónicas, observadas en la CGL, se distribuyen fundamentalmente por la periferia glomerular, por lo que sus dianas naturales serían células yuxtglomerulares, una importante parte de las cuales ejerce inhibición sobre las dendritas de las cM/Es. En este contexto, la activación de las células horizontales, por entradas glutamatérgicas procedentes de las cESs y cEMs integrantes del Sistema de Asociación Intrabulbar causaría la inhibición de determinadas poblaciones de células yuxtglomerulares, lo que conduciría, indirectamente, a una desinhibición de las propias cM/Es relacionadas con glomérulos isofuncionales a los que dieron origen a la proyección. De este modo se produciría un refuerzo mutuo de la activación de glomérulos que responden a un mismo odorante.

**CONCLUSIÓN:** La localización en la CPI y la proyección específica de su axón a la zona glomerular hace de las células horizontales mGluR1a-positivas un serio candidato a ser un elemento intermediario en el Sistema de Asociación Intrabulbar.

## **CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DE LAS NEURONAS POSITIVAS A mGluR1a**

Una vez conocida la distribución e identificados los elementos positivos para mGluR1a nos planteamos caracterizar estos tipos neuronales que comparten la

particularidad de expresar este receptor. La determinación de otras características neuroquímicas nos permitiría extraer información adicional susceptible de ser interpretada para conseguir datos adicionales que nos permitieran extrapolar sus propiedades funcionales y/u morfológicas.

### **VGLUT2 marcador de células glutamatérgicas**

Como se ha apuntado anteriormente, la totalidad de las células mitrales y una importante población de células empenachadas son positivas para mGluR1a. Tanto células mitrales como empenachadas reciben estimulación glutamatérgica por parte de los axones de las NROs y su excitación conduce a la liberación de glutamato (Liu y cols., 1989; Berkowicz y cols., 1994). Estas poblaciones neuronales son, por tanto, glutamatoceptivas y glutamatérgicas. Nos planteamos, por ello, estudiar la posibilidad de que el resto de elementos positivos al receptor, fueran elementos glutamatérgicos. Con este fin utilizamos técnicas de doble inmunofluorescencia para detectar la presencia de mGluR1a junto con el transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2).

Los VGLUTs son complejos proteicos que transportan selectivamente L-glutamato al interior de vesículas sinápticas en las sinapsis glutamatérgicas. Hasta el momento se han clonado tres subtipos diferentes (VGLUT1, VGLUT2 y VGLUT3) (Ni y cols., 1994; Aihara y cols., 2000; Gras y cols., 2002; Schäfer y cols., 2002; Takamori y cols., 2001, 2002). Debido a la ausencia de un marcador específico y fiable para identificar neuronas glutamatérgicas, la identificación de los VGLUTs supone, en el momento actual, la herramienta más fiable para este propósito, y dentro de los tres tipos, en concreto, el VGLUT2 (Fremeau y cols., 2002; Gras y cols., 2002; Hioki y cols., 2004). Aun así, esta herramienta tiene sus limitaciones, ya que su expresión se reduce significativamente durante el desarrollo postnatal, llegando a alcanzar niveles tan bajos en algunos tipos neuronales de determinadas regiones encefálicas en individuos adultos, que es complicado ponerlo de manifiesto mediante técnicas inmunohistoquímicas (Ohmomo y cols., 2009).

En nuestro estudio el marcaje para VGLUT2 mostró una intensa señal en los glomérulos olfatorios, derivada del marcaje de los axones de las NRO y de las



dendritas de cM/Es y de células yuxtglomerulares, alrededor de los cuales podían observarse los somas neuronales de éstas últimas. Bien es cierto que los somas de cM/Es aparecían sólo débilmente marcados.

La combinación de doble inmunofluorescencia mGluR1a-VGLUT2 mostró coexpresión de ambos marcadores en las cM/Es, como era de esperar. Respecto a las células yuxtglomerulares, la práctica totalidad de neuronas positivas para mGluR1a lo eran también para VGLUT2, aunque, en algunos casos, se observaron neuronas VGLUT2-positivas/mGluR1a-negativas. La expresión de VGLUT2 en la mayor parte de las neuronas yuxtglomerulares mGluR1a-positivas sería, en determinados casos, perfectamente esperable, pero, en otros, es relativamente sorprendente. Si consideramos que la población de células yuxtglomerulares positivas para mGluR1a está compuesta por cEEs y cPGs, la parte esperable del hallazgo sería la presencia de VGLUT2 en las cEEs ya que como células empenachadas, se han descrito como glutamatérgicas (Hayar y cols., 2004a, b). Sin embargo, resulta llamativa la naturaleza glutamatérgica de la subpoblación de cPGs. Estas células han sido clásicamente consideradas como inhibitorias, en concreto GABAérgicas (Shepherd y Greer, 1990). Posteriores estudios demostraron la existencia de una población GABAérgica (parte de la cual es, además, dopaminérgica) y otra no GABAérgica (Kosaka y cols., 1998; Toida y cols., 1998; Briñón y cols., 1999; Crespo y cols., 2003; Gutiérrez-Mecinas y cols., 2005), pero en todo caso de naturaleza inhibitoria.

Nuestro estudio muestra la existencia de una población, si bien no muy numerosa, de cPGs glutamatérgicas (además de glutamatoceptivas). La existencia de una subpoblación excitatoria dentro de las cPGs ya ha sido sugerida por algunos autores (Parrish-Aungst y cols., 2007; Kiyokage y cols., 2010). Este dato incrementaría la diversidad de microcircuitos intra e interglomerulares a través de los cuales se aumentaría notablemente las variedades del patrón espacio-temporal de excitación que generan las señales olfatorias desde el primer momento de la transmisión sináptica en la vía olfatoria.

**CONCLUSIÓN:** La inmensa mayoría de de las neuronas mGluR1a-positivas (glutamatoceptivas) son también glutamatérgicas. De especial relevancia es la existencia de cPGs que, a tenor de nuestros resultados, tienen naturaleza glutamatérgica.

### **Marcadores de células periglomerulares**

Por otra parte, las cPGs comprenden básicamente dos tipos de acuerdo con sus contactos sinápticos con los axones del nervio olfatorio (Kosaka y cols., 1998). El tipo I recibe, sobre sus dendritas, sinapsis por parte de los axones olfatorios, en el compartimento sensorial (axonal) del glomérulo. El tipo II recibe pocas o ninguna sinapsis directas desde el nervio olfatorio y sus dendritas se sitúan en el compartimento sináptico (dendrítico), fuera del compartimento sensorial. Las cPGs de tipo I son, además, GABAérgicas y expresan también dopamina o sintasa del óxido nítrico neuronal (Crespo y cols., 2003) y un pequeño grupo son no-GABAérgicas y contienen colecistoquinina o somatostatina (Gutiérrez-Mecinas y cols., 2005). El tipo II lo componen cPGs no-GABAérgicas que forman dos grupos en función de la expresión de calbindina D-28k o calretinina (Toida y cols., 1998).

Con objeto de caracterizar las cPGs positivas a mGluR1a, utilizamos técnicas de doble inmunofluorescencia combinando la detección de nuestro receptor con marcadores como tirosina hidroxilasa, calbindina D-28k y calretinina, que permiten identificar las poblaciones más numerosas y características de cPGs, tal como se ha descrito previamente (Baker y cols., 1983; Briñón y cols., 1992; Résibois y Rogers, 1992). No fue investigada la coexpresión con GABA ya que el hecho de que prácticamente todas las neuronas positivas a mGluR1a fueran glutamatérgicas (definidas por la expresión de VGLUT2) hacía innecesaria la búsqueda de esta colocalización.

Nuestros resultados demostraron la inexistencia de colocalización con ninguno de los tres marcadores mayoritarios de cPGs. Este resultado era esperable para el caso de la calbindina D-28k y la calretinina ya que éstos son marcadores de cPG de tipo II, que son aquellas que extienden sus dendritas en el compartimento dendrítico

del glomérulo (Toida y cols., 1998). Como pudimos determinar en nuestro estudio ultraestructural, los perfiles dendríticos positivos a mGluR1a aparecían principalmente asociados al compartimento axonal, es decir, a priori, serían cPGs de tipo I. Según este razonamiento, si las cPGs mGluR1a-positivas son de tipo I, y no son GABAérgicas, habría alguna posibilidad de que fueran dopaminérgicas, es decir, positivas para tirosina hidroxilasa ya que alguna de éstas se ha descrito como no GABAérgica (Kosaka y Kosaka, 2008). Sin embargo, nuestro estudio demostró la inexistencia de colocalización entre mGluR1a y tirosina hidroxilasa. Este dato es coincidente con el extraído del estudio de Ohmomo y colaboradores (2009) quienes apuntan que no existe coexpresión de VGLUT2 ni con GABA ni con tirosina hidroxilasa (recordemos que todas las mGluR1a-positivas son también VGLUT2-positivas). Sin embargo la inexistencia de colocalización entre mGluR1a y tirosina hidroxilasa, descrita en nuestro estudio, muestra cierta contradicción con el estudio de Jian y colaboradores (2010) quienes apuntan que, en el ratón, las cPGs dopaminérgicas (tirosina hidroxilasa-positivas) expresan ARNm para los mGluR del grupo I (mGluR1 y mGluR5). Además, estos autores demuestran que, en estas células, en presencia de agonistas para mGluR1, tiene lugar la clásica secuencia, activación de fosfolipasa C, hidrólisis de fosfoinosítidos y liberación de  $Ca^{2+}$  de los reservorios intracelulares mediada por inositol trifosfato, típica de los receptores acoplados a proteínas  $G\alpha_{q/11}$  (Mao y cols., 2008) como es mGluR1. Esta secuencia también fue descrita en otras poblaciones neuronales bulbares como células mitrales y células grano, que expresan mGluR1 y mGluR5 respectivamente (Geiling y Schild, 1996). En el caso de las cPGs dopaminérgicas, se ha observado que el resultado final de la activación de los mGluR1 es la liberación de  $Ca^{2+}$  desde lugares de almacenamiento intracelular a la que le sigue una activación de un intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  y la despolarización de la neurona (Jian y cols., 2010). Con respecto a nuestros resultados, es llamativa la discrepancia en lo que concierne a la expresión de mGluR1a en estas cPGs dopaminérgicas, ya que no detectamos coexpresión de ambos marcadores (mGluR1a y tirosina hidroxilasa), de modo que parecen estar presentes en poblaciones de cPGs no solapadas.

Encontramos, no obstante, varias posibles explicaciones para esta discrepancia. La más inmediata sería el que ésta podría ser una más de las diferencias descritas en la neuroquímica de las cPGs entre rata y ratón, ya que la relación entre ambos marcadores en la misma población de cPGs, a la que hemos hecho referencia, ha sido descrita en ratón (Jian y cols., 2010) mientras que nuestro estudio está realizado en rata. A este respecto hay datos que apoyan el hecho de que la composición neuroquímica de las cPGs muestra ciertas divergencias entre ratón y rata (Kosaka y Kosaka, 2005; Kiyokage y cols., 2010; Baltanás y cols., 2011).

Otra posible explicación sería el hecho de que, si bien Jian y cols (2010) detectan la presencia de ARNm para mGluR1 a través de su amplificación mediante PCR, es posible que la tasa de transcripción no sea demasiado alta, por lo que la presencia de receptor podría ser insuficiente para ser detectada mediante inmunohistoquímica y, por ello, la identificación de su presencia en las neuronas dopaminérgicas sería dificultosa. En este sentido hay casos de infraestimación del número real de elementos positivos a un marcador por la razón que apuntamos. Como ejemplo podemos señalar el caso de la expresión de GABA en cPGs, en las que mientras clásicamente se consideraba que aproximadamente el 20% de ellas eran GABAérgicas (Kosaka y cols., 1988), posteriormente se demostró que este número era muy inferior al real, debido a la limitada sensibilidad de los anticuerpos frente a GABA y/o GAD para detectar pequeñas cantidades del antígeno (Parrish-Aungst y cols., 2007). Por ello, no es descartable que determinadas poblaciones de cPGs (en concreto las dopaminérgicas) expresen de hecho mGluR1, pero en cantidades que resulten por debajo de los límites de sensibilidad de la técnica inmunohistoquímica.

Finalmente, otra posibilidad la constituye el que los mGluR1 presentes en las cPGs dopaminérgicas, tal como apunta el estudio de Jian y cols. (2010), se deba a isoformas diferentes a la mGluR1a (que nos ocupa en este estudio) pudiendo ser las isoformas mGluR1b, mGluR1c o mGluR1d las que se expresan en estas neuronas. En su estudio, estos autores no diferencian entre las distintas isoformas del receptor (Jian y cols., 2010). El hecho de que en nuestro estudio hayamos utilizado un anticuerpo

específico frente a la isoforma mGluR1a, que no presenta reactividad cruzada con las otras isoformas, podría suponer otra explicación a tal discrepancia.

**CONCLUSIÓN:** La población de cPGs positivas a mGluR1a pertenece, por su relación sináptica con los axones del nervio olfatorio, a las cPGs de tipo I. Dentro de éste, constituiría un subgrupo neuroquímico diferente (glutamatérgico) no solapado con los dos grandes subgrupos, GABAérgico y dopaminérgico.

### **Colecistoquinina y Neurocalcina: marcadores de células empenachadas**

Con el objeto de caracterizar neuroquímicamente las células empenachadas utilizamos la combinación, mediante doble inmunofluorescencia, del mGluR1a con neurocalcina o colecistoquinina.

La neurocalcina es una proteína ligante de calcio que se ha incluido dentro del grupo de las proteínas sensoras de calcio, grupo definido por la recoverina, una proteína ligante de calcio específica de los fotorreceptores (Ikura, 1996). Aunque su función exacta en las neuronas se desconoce, su detección inmunohistoquímica constituye una valiosa herramienta para la caracterización de diversos tipos celulares; en el bulbo olfatorio, específicamente, una amplia población de cEEs (Briñón y cols., 1998).

La colecistoquinina es un neuropéptido cuya expresión en poblaciones de neuronas bulbares fue descrita por vez primera por Seroogy y colaboradores (1985), quienes demostraron su expresión en una amplia población de células empenachadas, fundamentalmente cESs, cEMs y algunas cEPs, por lo que constituye un excelente marcador de estas poblaciones neuronales.

La neurocalcina pone de manifiesto una numerosa población de cEEs en la CGL. La población demostrada por este marcador es cuantitativamente similar a las cEEs positiva a mGluR1a, y muestran características morfológicas similares. En nuestras secciones hemos podido determinar que, aproximadamente un 30% de las cEEs positivas a mGluR1a, coexpresaban también neurocalcina. Este dato demuestra que la

población de cEEs es neuroquímicamente heterogénea. De acuerdo con nuestros resultados se podrían diferenciar al menos tres grupos: un grupo caracterizado por la expresión de neurocalcina, otro grupo que expresa neurocalcina y mGluR1a y además es glutamatérgico (positivo a VGLUT2) y otro grupo, positivo a mGluR1a y glutamatérgico que no expresa neurocalcina. Estos datos significan una caracterización complementaria de las cEEs y romperían la cierta homogeneidad que se consideraba que presentaba esta población de células yuxtaglomerulares tal como se describió en su momento (Briñón y cols., 1998).

Por su parte, el marcaje para colecistoquinina pone de manifiesto una gran población de células empenachadas, que principalmente se encuentran localizadas en el tercio superficial de la CPE y que corresponden a cESs y cEMs. También encontramos, aunque en número notablemente menor, algunas neuronas positivas a colecistoquinina en la región profunda de la CPE y que se corresponden con cEPs, tal como fue descrito previamente (Seroogy y cols., 1985). Los resultados del estudio de coexpresión de mGluR1a y colecistoquinina revelaron que la práctica totalidad de células empenachadas mGluR1a-positivas, lo eran también para la colecistoquinina. Esta colocalización, además, la encontramos preferentemente en las células empenachadas del tercio superficial de la CPE, siendo más infrecuente localizar células doblemente marcadas entre las cEPs. No obstante aún restaría una población relativamente numerosa que era colecistoquinina-positiva/mGluR1a-negativa. De este modo podemos definir dos poblaciones neuroquímicas dentro de las células empenachadas positivas a colecistoquinina en función de su coexpresión o no con mGluR1a. Aunque serían necesarios toda una serie de estudios complementarios, estos datos neuroquímicos sugieren la posible implicación de los diferentes grupos de células empenachadas en distintos circuitos bulbares, según el grado en que están involucrados en la transmisión glutamatérgica mediada por mGluR1a.

**CONCLUSIÓN:** Entre las cEEs podemos definir tres subpoblaciones en función de la expresión de neurocalcina, mGluR1a, o ambos marcadores. En el caso de las células empenachadas de la CPE se puede definir una

subpoblación que expresa colecistoquinina y mGluR1a, y otra que sólo expresa colecistoquinina. Estos datos demuestran la existencia de heterogeneidad neuroquímica entre las células empenachadas no descrita con anterioridad.

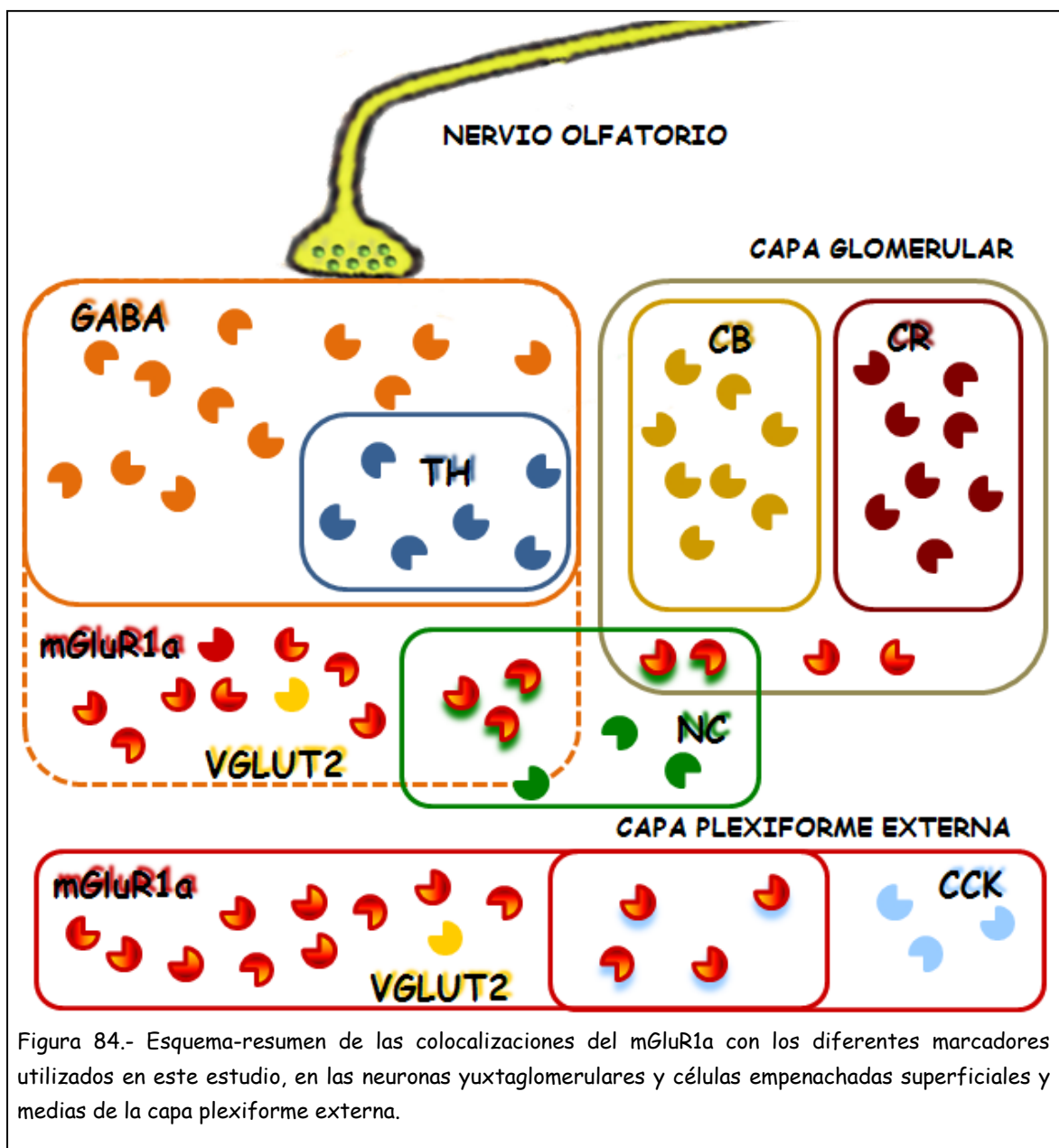


Figura 84.- Esquema-resumen de las colocaciones del mGluR1a con los diferentes marcadores utilizados en este estudio, en las neuronas yuxtglomerulares y células empenachadas superficiales y medias de la capa plexiforme externa.

## DEPRIVACIÓN OLFATORIA

Numerosos estudios han demostrado que la expresión del fenotipo dopaminérgico requiere de la actividad sensorial aferente y, por tanto, de la liberación de glutamato por parte de los axones olfatorios. Así, uno de los efectos más llamativos que tiene lugar tras la privación sensorial es la reducción de la expresión de tirosina hidroxilasa, el enzima limitante de la síntesis de dopamina, en neuronas yuxtglomerulares (Baker y Farbman, 1993; Cho y cols., 1996).

Además de éste, la privación olfatoria unilateral neonatal provoca cambios llamativos en la neurohistología y en la fisiología y neuroquímica del bulbo olfatorio. Estos cambios incluyen un llamativo descenso en el volumen bulbar (Brunjes, 1994) aunque no parece debido a la pérdida de neuronas (Hamilton y cols., 2008), y una reducción en la expresión de proteínas ligantes de calcio (Philpot y cols., 1997b) en diferentes poblaciones neuronales del bulbo olfatorio. También se han descrito alteraciones en la expresión de receptores, tal como ocurre para los receptores dopaminérgicos D2 (Guthrie y cols., 1991), adrenérgicos  $\beta 1$  y  $\beta 2$  (Woo y Leon, 1995a, b), la subunidad GluR1 del receptor AMPA de glutamato (Hamilton y Coppola, 2003), la subunidad NR2B de receptores NMDA (Kim y cols., 2006) o las isoformas 1 y 2 de GAD65 (Hamilton y cols., 2008), entre otros. Igualmente la privación tiene sus efectos sobre sistemas centrífugos que regulan la fisiología bulbar, reflejándose alteraciones en los sistemas noradrenérgico, colinérgico y serotoninérgico que inervan el bulbo desde regiones subcorticales (Briñón y cols., 2001; Gómez y cols., 2006, 2007a, b). Estos, y otros cambios, se interpretan como modificaciones plásticas que constituyen una estrategia para mejorar la disposición del sistema para detectar cualquier estimulación aferente por poca intensidad que ésta posea.

Respecto al inmunomarcaje para mGluR1a, hemos descrito llamativos cambios en los animales privados. Mientras que estos cambios eran muy evidentes en el bulbo ipsilateral a la narina ocluida, los bulbos contralaterales no mostraban ninguno de esos cambios y, en ellos, el marcaje era similar al que detectábamos en los bulbos de animales naïve. Nuestros resultados demuestran un notable incremento del inmunomarcaje, tanto en somas como en los procesos dendríticos de los elementos



implicados en la circuitería glomerular. El incremento del inmunomarcaje para el receptor en los procesos dendríticos se observa de modo evidente en las secciones de microscopía electrónica cuando se comparan secciones ultrafinas de glomérulos procedentes de bulbos deprivados frente a los controles (ver figura 64). Parte de este inmunomarcaje puede reflejar receptores que están siendo transportados a la membrana, o receptores que constituyen parte de un *pool* de reserva (ver más adelante). El incremento de la expresión haría más fácilmente inmunodetectable al receptor que en condiciones normales, donde podría encontrarse en cantidades por debajo del nivel de detección que permite la técnica inmunohistoquímica. Así, es probable que el incremento del número de células yuxtglomerulares que expresan mGluR1a en animales deprivados, se deba a que éstas lo expresarían también en condiciones control aunque en menor cantidad. Por otra parte, también es posible que en condiciones control, el receptor expresado en algunas estirpes neuronales fuera dirigido al extremo distal de las dendritas, quedando prácticamente ausente del soma neuronal, por lo que no éstos no podrían ser puestos de manifiesto.

La deprivación olfatoria provoca un aumento en el marcaje de los procesos dendríticos de células empenachadas situadas en el límite entre la CGL y la CPE lo que se traduce en una aparente compactación de la región superficial de la CPE. Ello hace que se deje de diferenciar la capa superficial de la CPE como menos densa al inmunomarcaje que la mitad profunda de la misma, como ocurre en condiciones control (Ver figuras 50, 59 y 65). Esta observación ha sido descrita por otros autores tanto en estudios de deprivación como de deaferenciación olfatoria para otros marcadores (Couper Leo y cols. 2000; Hamilton y cols., 2008). Es importante resaltar que los somas y las dendritas de las cESs y de las cEMs están distribuidos precisamente en esta región, la parte superficial de la CPE (Mori y cols. 1983; Scott, 1987), donde también se encuentran las dendritas apicales de diferentes subtipos de cGRs (Ennis y cols. 2007). Por tanto, la parte superficial y profunda de la CPE probablemente desarrollen funciones diferentes en la regulación de la salida de información del bulbo por parte de las cM/Es. Mediante registros de potenciales evocados se ha llegado a la conclusión de que las células empenachadas de la CPE generan una importante

cantidad de la actividad espontánea del bulbo (39%) (Karnup y cols. 2006), de la cual, las células que contribuyen en mayor medida a esta actividad son las células empenachadas (cESs y cEMs) que ocupan la región superficial de la CPE. En concordancia con lo anterior, se ha descrito que estas células son más fácilmente excitables tras la estimulación de los axones del nervio olfatorio que las células empenachadas localizadas más profundamente (Ezeh y cols. 1993), y, además, muestran una excitación más prolongada en respuesta a la estimulación olfatoria (Luo y Katz 2001) proceso en el que puede estar involucrado el mGluR1a, como se verá posteriormente. Así, las cESs y cEMs parecen ser, a priori, más sensibles y excitables a la estimulación olfatoria que las cEPs y cMs. El incremento en el inmunomarcaje observado en la parte superficial de la CPE podría reflejar los efectos de la reducción de entrada sensorial, específicamente sobre estos subtipos de células empenachadas más sensibles/excitables que tiene lugar tras la deprivación. En este sentido, consideramos, a la vista de nuestros resultados, que tiene lugar un incremento de la tasa de expresión de mGluR1a específicamente en estas poblaciones de células empenachadas que determinaría el cambio observado en la parte superficial de la CPE tras la deprivación olfatoria.

Nuestros resultados demuestran la presencia o ausencia del receptor en poblaciones específicas, su más alta tasa de expresión en condiciones de deprivación, que además va acompañada de un aumento de la forma dimérica del mismo, que establece, de algún modo, un mayor nivel de funcionalidad. En este sentido, mGluR1a presenta actividad constitutiva con respecto al tránsito de fosfoinosítidos, y se ha demostrado que el nivel de actividad independiente de agonista es proporcional al nivel de expresión del receptor (Prézeau y cols., 1996). De este modo, la mayor expresión del receptor en condiciones de deprivación aumentaría el nivel de actividad basal por él inducida, afectando así a todos los procesos en los que éste está implicado.

En un modelo de deaferenciación del sistema olfatorio, por eliminación de los receptores olfatorios en roedores mediante la irrigación del epitelio olfatorio con sulfato de zinc, se produce un incremento significativo de la expresión del ARNm para

mGluR1a dos días tras la deaferenciación (Ferraris y cols., 1997) y posteriormente se detecta un incremento de la expresión del propio receptor (Casabona y cols., 1998), datos que concuerdan con nuestros resultados. No obstante, aunque el incremento de receptor se mantiene a las dos semanas (Casabona y cols., 1998), a partir de ese momento tiene lugar una reducción en la expresión de su ARNm (Ferraris y cols., 1997). De hecho, en un modelo experimental similar, 20 días tras la deaferenciación también se produce una recuperación de marcadores como la tirosina hidroxilasa, cuya expresión se ve inicialmente reducida como consecuencia de la deaferenciación (Weruaga y cols., 2000). Este retorno a los valores normales de expresión estaría indicando la recuperación de la vía debido a la regeneración de los receptores olfatorios, lo cual no ocurre en nuestro modelo puesto que la privación se mantiene en el tiempo. Estos datos sugieren la existencia de mecanismos de plasticidad que permiten la modificación de la expresión de mGluR1a para compensar la reducción de estimulación aferente. Además, la inducción de esos cambios en su expresión se mantienen durante el tiempo en que perduran estas condiciones, tal como sugieren nuestros resultados y los de otros trabajos en otras regiones del SNC en los que se observa aumentada la expresión del receptor en la médula espinal durante más de 60 días tras el seccionamiento de nervios periféricos (Mills y cols., 2001b).

**CONCLUSIÓN:** La privación olfatoria unilateral neonatal provoca un incremento de la expresión de mGluR1a, a la vez que tiene lugar una redistribución del mismo en dominios dendríticos donde no se expresa en condiciones control. Estos datos apuntan a la existencia de un mecanismo plástico de compensación ante la ausencia de estimulación glutamatérgica directa dirigida a incrementar la sensibilidad a la entrada de glutamato y el posibilitar la activación de los procesos en los que este receptor está implicado.

### **Estudios de colocación en condiciones de privación**

Como hemos apuntado anteriormente, la privación provoca un incremento en la intensidad de marcaje general para el mGluR1a, así como la presencia de un mayor

número de células yuxtaglomerulares positivas al mismo. De acuerdo con esto, la tasa de coexpresión con los marcadores utilizados debiera sufrir modificaciones, siempre que la expresión de estos se mantuviera invariable en estas condiciones.

Respecto a la coexpresión con VGLUT2, no observamos cambios en la tasa de coexpresión, de modo que la práctica totalidad de elementos mGluR1a-positivos también coexpresaba VGLUT2. Si asumimos que la privación produce un incremento en la detección de elementos positivos a mGluR1a, estos resultados sugerirían que la expresión de VGLUT2, en condiciones de privación, se comportaría del mismo modo que el receptor, aumentando su expresión en determinadas poblaciones. La expresión de VGLUT2 en el bulbo olfatorio es alta durante las primeras semanas de desarrollo postnatal en las que aún tiene lugar el proceso de generación de algunas subpoblaciones interneuronales y durante las cuales se está produciendo el establecimiento y maduración de los circuitos bulbares, procesos en los que es fundamental la señalización glutamatérgica y de ahí la alta expresión de VGLUT2. Una vez finalizados estos procesos, la expresión del transportador se reduce a niveles basales (Ohmomo y cols., 2009). Como consecuencia de la privación se produce un reordenamiento sináptico, especialmente patente en la CGL (Brunjes, 1994), que se asemejaría al proceso que acontece durante el desarrollo postnatal, lo cual conllevaría la regulación positiva del VGLUT2, tal como hemos observado.

Respecto a los marcadores con los que no existía colocalización en condiciones control (tirosina hidroxilasa, calbindina D-28k y calretinina) se sigue manteniendo el mismo patrón de ausencia de coexpresión. La expresión de estos marcadores, además, sufre una regulación negativa (más o menos intensa) en condiciones de privación tal como fue descrito en estudios precedentes (Baker y cols., 1983; Philpot y cols., 1997b), por lo que el resultado hallado en condiciones de privación entra dentro de lo esperable.

La expresión de marcadores de células empenachadas (neurocalcina y colecistoquinina) también se ven afectados en los bulbos privados, sufriendo una reducción en los elementos positivos a los mismos, que es ligero para el caso de la neurocalcina, y más marcado en el caso de la colecistoquinina (observaciones

personales). Como hemos apuntado anteriormente, la privación provoca un incremento en el número de células yuxtglomerulares positivas a mGluR1a, entre las que se encuentran las cEEs (positivas a neurocalcina), mientras que no parece variar el número de los tipos de células empenachadas positivas a mGluR1a que se sitúan en la CPE. En cualquier caso, la reducción de los elementos positivos a neurocalcina y colecistoquinina, junto con el aumento total de expresión de mGluR1a, hace que la tasa de coexpresión de estos marcadores baje en términos relativos, de modo que encontramos más elementos mGluR1a-positivos que no coexpresan estos marcadores. Sin embargo, llamativamente, la tasa de coexpresión se mantiene más o menos invariable en términos absolutos. Dicho de otro modo, la reducción de neuronas que expresan neurocalcina o colecistoquinina, afecta sólo al grupo de neuronas que no coexpresan mGluR1a. Con los datos derivados de nuestro estudio la explicación a este fenómeno se hace complicada y sólo puede ser especulativa. En este sentido, no sería descartable que el incremento de expresión de la forma dimérica (activa) del receptor, como hemos demostrado en nuestro trabajo, incremente los niveles de actividad constitutiva del receptor como demostraron Prézeau y colaboradores (1996). Dado que la reducción de la expresión de diferentes marcadores (tanto neurotransmisores como proteínas ligantes de calcio) vienen determinadas por la reducción de la actividad (Baker y cols., 1983; Baker y Farbman, 1993; Cho y cols., 1996; Philpot y cols., 1997b), es posible que la dinámica inducida por la actividad constitutiva del propio receptor sea capaz de mantener la expresión de estos marcadores en niveles cercanos a las condiciones control.

**CONCLUSIÓN:** Los marcadores utilizados para conseguir la caracterización neuroquímica de las poblaciones positivas a mGluR1a también se ven afectados por el proceso de privación, aunque de diferente modo. La expresión de VGLUT2 muestra un cierto paralelismo con la de mGluR1a, apareciendo en todas las neuronas que expresan el receptor. Por su parte, el número de neuronas positivas a neurocalcina y colecistoquinina ven reducido su número pero, llamativamente, la tasa de colocación con mGluR1a se mantiene en términos absolutos,

produciéndose la reducción de la expresión en las poblaciones que no coexpresan el receptor. Consideramos, por tanto, que la presencia del receptor induce un cierto nivel de actividad neuronal que permite el mantenimiento de la expresión de estos marcadores.

## DEL ESTUDIO PROTEICO

### CONSIDERACIONES TÉCNICAS EN EL ESTUDIO PROTEÓMICO:

**De la terminología:** Es habitual, en la literatura, utilizar los términos desnaturalizantes y reductor de manera indistinta, como una misma condición, y del mismo modo cuando se habla de nativo y no-reductor. Debemos aclarar que, en sentido estricto, desnaturalizante y reductor no son realmente términos equivalentes, ni tampoco lo son los términos nativo y no-reductor. Las condiciones desnaturalizante o nativa hacen referencia al plegamiento de la estructura proteica, a su conformación, mientras que el entorno reductor o no-reductor implica básicamente a la estabilidad o no de las interacciones covalentes por puentes disulfuro. De manera que se pueden establecer cuatro situaciones diferentes por la combinación de estos términos: desnaturalizante/reductor, desnaturalizante/no-reductor, nativo/reductor y nativo/no-reductor. No obstante, hemos comprobado la aceptación generalizada, en los trabajos científicos, del uso indistinto de los términos desnaturalizante/reductor, y nativo/no-reductor, reduciendo la terminología SDS-PAGE/Westernblotting a estas dos modalidades.

De forma similar, en nuestro estudio consideramos condición nativa a la situación experimental más favorable para la conformación proteica original, debido al uso de un detergente no agresivo en la solubilización, a la ausencia de pasos de ebullición y a la eliminación del agente reductor en la preparación de la muestra, previa a la carrera electroforética. Pero no hay que olvidar que, en realidad, esta carrera se ha llevado a cabo en presencia de SDS, al igual que en condiciones desnaturalizantes/reductoras, que no supone un entorno nativo en sentido estricto, por lo que no debemos descartar que las proteínas hayan migrado, al menos parcialmente, desplegadas. En caso contrario, la ausencia de SDS en la carrera electroforética nos hubiera obligado a modificar la composición de los tampones así como las condiciones eléctricas de la carrera, de manera que no respetaríamos la homogeneidad experimental con el análisis en condiciones desnaturalizantes/reductoras. Esto hubiera supuesto un

aumento de variables experimentales que complicaría la comparación de los resultados obtenidos en condiciones nativas con los obtenidos en condiciones desnaturalizantes, dificultando la inferencia de conclusiones. Sin embargo, en nuestro estudio hemos respetado el procedimiento electroforético, sin modificar las condiciones de carrera en ambos ensayos, de manera que los patrones obtenidos puedan ser comparables en las diferentes situaciones.

**Del análisis comparativo:** Hay que tener en cuenta que en nuestro estudio realizamos lo que en términos financieros llamaríamos un análisis de datos cruzados, es decir, un análisis proteico en vertical de dos sistemas, comparando la expresión del receptor en bulbo control vs bulbo privado, un análisis horizontal, comparando las condiciones desnaturalizante/reductora y nativa/no-reductora y, en paralelo, un análisis cruzado de ambas condiciones en cada uno de los dos sistemas. Cuando se realizan estudios de comparaciones simultáneas se debe minimizar la cantidad de variables a estudiar para evitar un análisis complejo que pueda dar lugar a falsos positivos o negativos. Para evitar esta complejidad realizamos el estudio comparativo variando sólo aquel o aquellos factores de interés, en este caso el detergente y el agente reductor, de manera que el resto del entorno experimental se vea modificado en el menor grado posible. Esto no sólo nos permitirá cotejar los resultados en las dos condiciones de análisis sino también la comparación de nuestros resultados con los de otros estudios.

**De la unificación de la técnica:** Ha sido difícil encontrar en la literatura un criterio unificado o un protocolo general estandarizado para el desarrollo del estudio proteico. Existen casi tantos protocolos como especies proteicas, cada uno adaptado al entorno y naturaleza de la proteína, y al objetivo del estudio. Además, esta falta de consenso se complica más porque el procedimiento completo implica el paso por muchas etapas diferentes y cada una con muchos parámetros susceptibles de variación. A esto hay que añadir que, en la mayoría de las ocasiones, los protocolos no aparecen descritos de forma detallada.

Parece ser que esta dificultad se ha ido arrastrando durante años en la comunidad científico-proteómica, y a ello hacen alusión Jones y Gibson (2007), entre



otros, como una "falta de datos estándares aceptados por la comunidad, de herramientas para facilitar el intercambio de datos y de un control del vocabulario, para asegurar una terminología uniforme que permita describir la metodología experimental".

Intentando prevenir estas dificultades, tomamos como referencia los protocolos descritos por Marzoa y colaboradores (2009) en los cuales adaptan las técnicas electroforéticas y de transferencia habituales a los procedimientos de solubilización más adecuados para el estudio de complejos proteicos de membrana, y que, además, podemos ajustar fácilmente tanto a las condiciones desnaturalizantes como a las nativas sin alterar drásticamente la metodología experimental. Así conseguimos dar un formato uniforme que podemos aplicar para que el entorno experimental sea homogéneo en ambas condiciones, y en el que sólo modificamos las variables que más pueden afectar a la obtención de formas diméricas de la proteína, el detergente y el agente reductor. De esta manera podemos comparar ambas condiciones sin adulterar los resultados, aun siendo conscientes de que probablemente sacrificamos algunos aspectos como el rendimiento, la eficacia y la resolución de otros protocolos, pero que no pueden ser adaptados a ambas condiciones.

**De la elección de los detergentes:** Para el análisis en condiciones desnaturalizantes decidimos utilizar como detergente, en la fase de solubilización, Triton X-100 tal como aconseja el protocolo de Marzoa y colaboradores (2009). Es el detergente más comúnmente usado en la mayoría de los protocolos para la solubilización de proteínas integrales de membrana (Okamoto y cols., 2001).

El Triton X-100 se considera un detergente suave (Kashino, 2003) que no desorganiza drásticamente los complejos proteicos de membrana y que respeta la estructura de estos complejos proteicos y la organización de la membrana, a diferencia del SDS, porque rompe preferentemente las interacciones lípido-lípido o lípido-proteína antes que las interacciones proteína-proteína. Así la membrana se va fragmentando de una forma más organizada y menos agresiva. Por ello, el Triton X-100 es uno de los detergentes más apropiados para la solubilización de complejos

proteicos integrales de membrana (Okamoto y cols., 2001; Kashino, 2003; Marzoa y cols., 2009).

Aparte del Triton X-100, existen otros detergentes considerados desnaturalizantes suaves y cuyo uso también es recomendable para la solubilización de proteínas de membrana, como el n-dodecil- $\beta$ -D-maltósido (DDM) o la digitonina (Kashino, 2003; Speers y Wu, 2007). Pero, a diferencia de los anteriores, y según estudios previos, el Triton X-100 respeta más los estados de asociación proteica a modo de complejos oligoméricos que otros detergentes de su clase, en cuya presencia estos complejos proteicos se desestabilizan en subcomplejos o en subunidades monoméricas (Sánchez y cols., 2009; Marzoa y cols., 2010). Estudios previos sobre la caracterización bioquímica y farmacológica del receptor ionotrópico de glutamato AMPA, que son complejos multiméricos en su estado nativo, demuestran, no sólo que estos complejos permanecen intactos tras solubilización con Triton X-100 (Wenthold y cols., 1992), sino que, además, esta solubilización mantiene la conformación de los sitios de unión al ligando de forma similar a como aparecen cuando están anclados en la membrana (Hunter y cols. 1990). Por ello hemos considerado que, de entre los diferentes detergentes apropiados para el estudio de proteínas de membrana, el Triton X-100 es el que más respeta la conformación nativa de los complejos proteicos y, por tanto, es el que nos proporcionaría la mejor extracción de dímeros-mGluR1a nativos y estables.

La tercera razón para la elección del Triton X-100 está relacionada con la localización del mGluR1a en la membrana, en relación con las zonas de densidad postsináptica, y en principio puede parecerse contradictoria, pero analicemos el por qué. El célebre modelo de "mosaico fluido" de la membrana plasmática (Singer y Nicolson, 1972) describe la organización y el movimiento de lípidos y proteínas. A esto hay que añadir el que algunos dominios de la membrana, conocidos como *lipids rafts* (Karnovsky y cols, 1982) presentan una fluidez diferente a la del resto de la membrana. Estos *lipids rafts* son abundantes en las zonas de densidad postsináptica y se consideran fundamentales para el funcionamiento de la misma (Bruses y cols., 2001; Suzuki, 2002), donde se aprovecha diferente grado de fluidez como un

mecanismo para "secuestrar" receptores, además de otras proteínas necesarias en la zona activa de la sinapsis (Mayor y Rao, 2004). De hecho, el movimiento de los receptores y la regulación de su número en la sinapsis está controlado por la actividad neuronal, y es uno de los principales mecanismos en los fenómenos de plasticidad neural (Choquet y Triller, 2003). Pues bien, estos *lipids rafts* son conocidos también como TIRF (*Triton x-100 insoluble floating fraction*), porque son dominios resistentes al Triton X-100 a 4° C (Hooper y cols., 1988; Brown y Rose, 1992; Smart y cols., 1995; London y Brown, 2000; Zheng y Foster, 2009). ¿Cómo podemos extraer la proteína de un dominio que es insoluble? En principio puede parecer algo contradictorio conciliar la insolubilidad de estos dominios con el hecho de que el Triton X-100 se considere uno de los detergentes más adecuados para la extracción de proteínas integrales de membrana. En realidad, esta insolubilidad al Triton X-100 se produce a una temperatura de 4°C, característica que se aprovecha para aplicarlo a la separación de diferentes dominios membranales en función de su densidad en gradientes de sacarosa. Por ello, para evitar problemas de resistencia al detergente, en la extracción de proteínas se recomienda realizar la solubilización de la muestra a temperatura ambiente, siempre a una temperatura superior a 8°C (Ahmed y cols., 1997; London y Brown, 2000; Okamoto y cols., 2001; Carboni y cols., 2002; Dmitriev y cols., 2005), en vez hacerlo en frío, como se hace habitualmente para prevenir la degradación proteica. Además, aunque esta insolubilidad no fuera dependiente de temperatura, no significaría un gran problema para nuestro estudio, ya que esta insolubilidad se atribuye al contenido en glicosfingolípidos (Schroeder y cols., 1994) y, de hecho, diferentes estudios de solubilización de proteínas dentro de estos dominios, indican que las proteínas resistentes a la extracción con Triton X-100 son las que se encuentran ancladas a la membrana mediante residuos glicosilfosfatidilinositol y, específicamente, algunos componentes de las llamadas caveolas, que establecen interacciones directas con el colesterol y con los glicosfingolípidos, lo cual no es el caso del receptor de nuestro estudio que es una proteína integral (Rothberg y cols., 1992; Brown y Rose., 1992; Lisanti y cols., 1993; Okamoto y cols., 2001). En cuanto a las proteínas integrales de membrana, no sólo no

tenemos referencias de que sean resistentes al detergente, sino que, además, y como ya hemos comentado, este detergente ha sido calificado como uno de los más apropiados para la solubilización de estas proteínas (Ohlendieck, 1996; Okamoto y cols., 2001; Marzoa y cols., 2009; Kashino, 2003; Speers y Wu, 2007).

Con todo ello nos aseguramos que la solubilización con Triton X-100 no sólo nos proporciona la extracción de nuestro receptor transmembranal, sino que, además, la desnaturalización de la membrana será suave y secuencial al eliminar los componentes lipídicos que rodean a la proteína de interés, mientras que la solubilización con SDS es más agresiva, menos secuencial y puede arrastrar mayor proporción de proteínas de membrana disociadas al azar al fragmentar la membrana de una forma más indiscriminada.

**De la degradación proteica post-extracción:** muchos son los protocolos que recomiendan la adicción de inhibidores de proteasas para prevenir la degradación proteica durante la solubilización. No obstante, según indican otros estudios, no se detectan diferencias evidentes entre las muestras tratadas con y sin inhibidores de proteasas, demostrando que se puede obtener una buena recuperación de proteínas sin degradación en ausencia de estos inhibidores (Carboni y cols., 2002).

Otra acción preventiva de la degradación proteica, y bastante habitual en los protocolos de estudios desnaturalizantes, es llevar a ebullición la muestra antes de cargarla en el gel. Este paso no sólo se realiza para prevenir la degradación, sino que, además, contribuye a una mayor desnaturalización ya que la mayoría de los detergentes aumentan su solubilidad a altas temperaturas. Vayamos por partes. Por un lado, en el análisis nativo/no-reductor pretendemos que el receptor de nuestro estudio se mantenga en un estado conformacional lo más parecido posible al que se encuentra en condiciones nativas, cuando está integrado en la membrana. Por ello en los estudios nativos o no-desnaturalizantes se recomienda evitar hervir la muestra antes de cargarla (Romano y cols., 1996a, b; Copani y cols., 2000; Romano y cols., 2001). Por otro lado, como hemos visto anteriormente, las bajas temperaturas afectan a la solubilización con Triton X-100, pero veamos ahora como las altas temperaturas también influyen en su solubilidad. El aumento de temperatura induce la

asociación de las micelas que forma el detergente, hasta un punto en el que ya no se pueden mantener en disolución, provocando la llamada "turbidez" de la solución. La temperatura a la que se produce este fenómeno se conoce como "punto de nube", y su valor depende del número de grupos polioxietileno del detergente no-iónico. En el caso del Triton X-100 esta temperatura es de 64° C, y temperaturas superiores producen la insolubilidad del Triton X-100 (Neugebauer, 1990). Por ello decidimos evitar la ebullición para el procedimiento en condiciones nativas y, a la vez, decidimos no realizarlo tampoco en el procedimiento desnaturizante para minimizar, como ya hemos comentado, la diversificación de variables a comparar. Pero, ¿estamos sacrificando con esto el procedimiento en condiciones desnaturizantes?

En el caso de las condiciones desnaturizantes no tenemos evidencias de que la ebullición de la muestra mejorara de forma decisiva la extracción proteica, ya que se ha demostrado en diferentes ensayos de electroforesis/Westerblotting que la eliminación de este paso de ebullición apenas modifica los resultados en comparación con los obtenidos tras hervir la muestra, sugiriendo que la ebullición no afecta ni a la eficacia y ni al rendimiento de la técnica (Dmitriev y cols., 2005).

La última razón por la que hemos decidido no hervir la muestra antes de cargarla en el gel está relacionada con el alto peso molecular del receptor en el que hemos centrado nuestro estudio. Está demostrado que la ebullición induce la agregación de proteínas de alto peso molecular, dificultando la entrada eficiente de la proteína en el gel (Romano y cols., 1996a, b; Copani y cols., 2000; Al-Tubuly, 2000; Romano y cols., 2001; Okamoto y cols., 2001). Por esto, la mayoría de los protocolos adaptados a la detección de proteínas de alto peso molecular recomiendan no hervir la muestra, sobre todo en el estudio de proteínas de membrana multipaso, como es nuestro caso, ya que el mGluR1a es un receptor 7-hélices transmembrana. En estos casos, si se desea aumentar la temperatura con el fin de aumentar la solubilidad del detergente, sólo es aconsejable calentarla a temperaturas que no sobrepasen los 90°C, ya que por debajo de esta temperatura desciende la posibilidad de agregación proteica. En nuestro estudio hemos minimizado la posible agregación calentando las muestras a 37°C durante 15 min tanto en condiciones desnaturizantes como nativas.

Una vez comentadas las consideraciones técnico-metodológicas, queremos hacer hincapié en que hemos adaptado el protocolo para dar la mayor uniformidad posible en ambas condiciones experimentales, desnaturalizante y nativo, descartando que las variaciones de uno a otro sean debidas a algo que no sea el detergente o el agente reductor, excluyendo, evidentemente, las modificaciones inducidas por la deprivación olfatoria.

### **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL mGluR1a**

**De la detección de la conformación monomérica en condiciones nativas:** Como era de esperar, en condiciones desnaturalizantes hemos detectado una alta expresión de la conformación monomérica del mGluR1a, pero esto no era tan esperable en condiciones nativas, ya que algunos autores describen la única y exclusiva presencia de bandas correspondientes a los dímeros del mGluR1a en ausencia de agentes reductores, descartando completamente la aparición de monómeros en estas condiciones (Romano y cols., 1996a, b). Por el contrario, nuestros resultados demuestran, al igual que en los estudios realizados por Ray y Hauschild (2000), que en ausencia de agente reductor, no todo el receptor se desplaza hacia la conformación dimérica, sino que una parte sigue apareciendo como mGluR1a-monómero.

Frente a esta controversia podemos argumentar que la ausencia de agente reductor puede implicar la no disociación de los complejos diméricos, pero no tiene por qué implicar lo contrario, es decir, que los monómeros tengan que asociarse para formar dímeros.

¿Por qué parece probable, de antemano, detectar monómeros-mGluR1a? El mGluR1a se sintetiza en la célula como monómero en el retículo endoplasmático (Robbins y cols., 1999; Selkirk y cols., 2002), y no habría razón, a priori, para suponer que éstos no están contenidos previamente en el extracto celular. Por ello interpretamos que la fracción monomérica del mGluR1a que detectamos en condiciones nativas representa el *pool* de mGluR1a que está siendo sintetizado, anclado a la membrana del retículo endoplasmático. Además, probablemente estos monómeros se encuentran como especies no-totalmente procesadas, en una fase

inicial de maduración proteica en la que todavía no han tenido lugar modificaciones postraduccionales, ni mucho menos, procesos de dimerización (Robbins y cols., 1999; Selkirk y cols., 2002; Ray y Hauschild, 2000).

**CONCLUSIÓN:** existe una fracción monomérica del mGluR1a que se mantiene en ausencia de agentes reductores y, por lo tanto, preexisten en la célula como tales monómeros.

La conformación monomérica del receptor es inactiva, no se expresa en la superficie celular, sino que está anclada al retículo endoplasmático formando un *pool* intracelular (Romano y cols., 1996a, Ray y Hauschild, 1998, 2000; Copani y cols., 2000; Remelli y cols., 2008), y según nuestros resultados esta fracción del mGluR1a es la que menos se modifica en ausencia de estimulación olfatoria en comparación con el resto de las fracciones, sólo aumenta un 1.28% (de un total del 10.05%). Por todo ello interpretamos que se trata de un *pool* mantenido en un cierto equilibrio, independientemente de las condiciones, a modo de reservorio a la espera de completar su procesamiento y dimerización cuando lo requiera la actividad neuronal.

**CONCLUSIÓN:** existe una fracción de monómeros-mGluR1a en la célula que corresponde a los monómeros recién sintetizados en la membrana del retículo endoplasmático y que, probablemente, constituyan un *pool* de reserva.

**De la detección de la conformación dimérica en condiciones desnaturalizantes:** De forma análoga al razonamiento que hemos seguido para la forma monomérica, en condiciones nativas hemos detectado, como era de esperar, la presencia de dímeros-mGluR1a que, además, representan la banda predominante. Sin embargo también aparece esta banda en condiciones desnaturalizantes, a la cual nos hemos referido en la sección de Resultados como "fracción dímero-BME resistente".

Según se ha descrito, la dimerización del mGluR1a depende de un único puente disulfuro intermolecular que se forma entre los residuos de Cys-140 del extremo amino-terminal en el dominio extracelular de ambos monómeros (Romano y cols.,

1996a; Ray y Hauschild, 2000; Jingami y cols., 2003). Pero no es el único puente disulfuro que se establece en el receptor. La estructura del mGluR1a contiene un total de 21 residuos de cisteína (Tanabe y cols., 1992; Romano y cols., 1996a), de los cuales, sólo 9 residuos se encuentran formando puentes disulfuro. La Cys-140 establece un puente disulfuro intermolecular en el dímero, pero los otros 8 residuos de cisteína se encuentran formando puentes disulfuro: Cys67-Cys109, Cys289-Cys291, Cys378-Cys394, y Cys432-Cys439 (base de datos UniProt). Estos puentes disulfuro también son susceptibles de ser reducidos por el  $\beta$ -mercaptoetanol, aunque su pérdida no afecte a la disociación del dímero.

¿No es suficiente la cantidad de  $\beta$ -mercaptoetanol utilizada en nuestro estudio como para romper todos los puentes disulfuro del mGluR1a que hay en la muestra? No parece probable si tenemos en cuenta que hemos utilizado un 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol, que es la concentración de agente reductor más habitual y recomendada en la mayoría de protocolos y, evidentemente, damos por hecho que esta concentración recomendada es la concentración máxima efectiva para un estudio en condiciones reductoras. Por otro lado, algunas evidencias sugieren que concentraciones de entre 1-10 mM de DTT (que son equivalentes a 0.25%-2.5% de  $\beta$ -mercaptoetanol) son suficientes para inducir la completa separación de los dímeros mGluR1 en sus monómeros (Romano y cols., 1996a; Copani y cols, 2000). Sin embargo, coincidiendo con nuestros resultados, otros estudios describen la presencia de bandas correspondientes a los dímeros del receptor, lo que indica que no se alcanza la disociación total de los dímeros, ni siquiera en presencia de cantidades de agente reductor incluso superiores a las anteriormente apuntadas (Tsuji y cols, 2000; Ray y Hauschild, 2000; Romano y cols., 2001). Estos estudios confirman que la formación del puente disulfuro es necesaria para la dimerización, pero descartan que éste sea suficiente para mantener y estabilizar los dímeros. A pesar de que la Cys-140 es un residuo crítico en la dimerización se ha sugerido que también intervienen otros tipos de interacciones (Tsuji y cols, 2000; Ray y Hauschild, 2000; Romano y cols., 2001). De hecho, la transfección en células HEK de un receptor mGluR1a mutante en su residuo Cys-140, permite la formación de dímeros (Ray y Hauschild, 2000). También hay



evidencias de que otras mutaciones que provocan la pérdida conformacional del puente disulfuro, retienen la capacidad de formar receptores dímeros por uniones no-covalentes (Tsuji y cols., 2000). Aunque los diferentes estudios coinciden en que el sitio de interacción no-covalente está localizado, probablemente, también en el dominio extracelular, todavía no se han identificado los residuos responsables de esta interacción (Robbins y cols, 1999; Ray y Hauschild, 2000; Romano y cols., 2001). Hasta la fecha sólo se ha sugerido que estas interacciones no-covalentes implicadas en la interfase dimérica pueden ser de carácter electrostático y/o hidrofóbico, y que, probablemente, son resistentes al SDS (Armstrong y cols., 1998; Tsuji y cols, 2000; Romano y cols., 2001).

A diferencia de los estudios de Romano y cols. (1996a, b), nuestro análisis, y otros anteriormente mencionados, no muestran una exclusividad de bandas, ni exclusivamente aparecen monómeros en presencia de agente reductor, ni exclusivamente dímeros en ausencia de este. Con esto, nuestros resultados también apoyan la idea de la intervención de otras interacciones adicionales a los puentes disulfuro en la dimerización del mGluR1a. Además, y coincidiendo con los estudios de Ray y Hauschild (2000), no sólo en presencia de agente reductor aparece una banda de dímero, aparte de la banda mayoritaria de monómero, sino que, además, en ausencia del mismo, aparte de la banda dimérica, aparece una pequeña banda de monómeros. Además en este estudio, Ray y Hauschild (2000) hacen referencia a la fracción de mGluR1a-dímero que detectan en presencia de agente reductor como "receptor SDS-resistente", mientras que nosotros hemos decidido denominarla fracción "dímeros-BME resistentes". Nuestros resultados, en cuanto a la presencia de estos dímeros, están también apoyados por otros estudios sobre oligomerización de diferentes receptores acoplados a proteína G, que concluyen que la disociación del dímero, al tratar con agentes reductores, no se detecta por igual para todos los tipos de receptores, ni se consigue siempre disociar completamente el dímero, incluso en los casos en que el receptor es sensible al tratamiento (Lee y cols., 2000). Además, también se ha sugerido que la sensibilidad de algunos complejos proteicos al agente reductor depende de la accesibilidad de los puentes disulfuro intermoleculares

(Copani y cols., 2000). No obstante, no podemos afirmar que la resistencia sea al SDS, al BME o a ambos, por lo que serían necesarias más pruebas para confirmar si la sensibilidad es al detergente o al agente reductor. Pero sea como fuere, lo que sí podemos confirmar, a la vista de nuestros resultados, es que la conformación dimérica del mGluR1a no depende exclusivamente de los puentes disulfuro.

CONCLUSIÓN: Es posible detectar dímeros-mGluR1a en presencia de agentes reductores y, por tanto, la conformación dimérica del mGluR1a no depende exclusivamente de los puentes disulfuro intermoleculares.

La mayoría de los autores coinciden al señalar que la funcionalidad del mGluR1a se atribuye a su conformación dimérica y a su localización en la membrana plasmática (Romano y cols., 1996a, Ray y Hauschild, 1998, 2000; Copani y cols., 2000; Remelli y cols., 2008). También sugieren que el receptor activo debe estar totalmente procesado y glicosilado, aunque, en este sentido, hemos encontrado discrepancias con algunos estudios que muestran evidencias de que la dimerización del receptor no requiere una glicosilación previa (Robbins y cols., 1999). Es más, la pérdida de la glicosilación por exposición a tunicamicina, un inhibidor de la N-glicosilación, no sólo no afecta a la dimerización, sino que, además, no interfiere en el tráfico del receptor, ni a la expresión del mGluR1a en la superficie celular, ni tampoco afecta a la activación de la fosolipasa C (Mody y cols., 1999).

En todo caso, en lo que sí coinciden la mayoría de los estudios, es que la dimerización sí es necesaria para la activación del receptor, ya sea una dimerización mediada por puentes disulfuro o por interacciones no-covalentes (Romano y cols., 1996a, Ray y Hauschild, 1998, 2000; Copani y cols., 2000; Romano y cols., 2001; Remelli y cols., 2008). De esta manera, podemos confirmar, según nuestros resultados, que la banda de 260 kDa que detectamos, corresponde a la forma activa del receptor. Incluso hemos considerado, teniendo en cuenta algunos análisis previos, que, además, esta proteína se corresponde con la forma totalmente procesada, glicosilada, que migra a la banda de los 260-270 kDa (Ray y Hauschild, 2000; Chan y cols., 2001). Pero ¿no sería más lógico detectarla en una banda de mayor peso

molecular? Basándonos en evidencias previas, la variación de peso molecular detectada entre la forma glicosilada y la no-glicosilada del mGluR1a es de aproximadamente 10 kDa (Romano y cols., 1996a) y, teniendo en cuenta que la conformación oligomérica de una proteína suele migrar a un peso molecular ligeramente inferior al que corresponde a la suma de las subunidades, y que el radio de Stokes comprime el volumen estructural de la molécula, disminuyendo aparentemente la masa molecular, entonces podemos asumir que los dímeros que hemos detectado corresponden al mGluR1a totalmente procesado, dimerizado y funcional.

Como ya hemos apuntado, una vez sintetizados los monómeros-mGluR1a, dimerizan en el mismo retículo endoplasmático antes de ser transportados a la superficie celular (Robbins y cols., 1999; Selkirk y cols., 2002; Nakamura y cols., 2004) de manera que no podemos descartar que, al menos una parte de esta fracción dimérica se encuentre aún anclada a la membrana del retículo a la espera de ser transportados a la superficie celular. No obstante, estos dímeros también se consideran parte de la población activa del receptor, en cuanto a que van a ser inmediatamente puestos en circulación. De no ser así no estarían aún dimerizados y totalmente procesados, y se mantendrían como parte del *pool*/monomérico intracelular en *stand-by*.

**CONCLUSIÓN:** los dímeros-mGluR1a totalmente procesados, que están en la superficie celular, o que van a ser transportados a ésta de forma inmediata, migran a la banda de los 260-270 kDa.

**De la identidad de las especies proteicas que migran a las bandas de los 150 y 160 kDa:** En nuestro estudio además de las bandas correspondientes a las especies monomérica y dimérica del mGluR1a detectamos una fracción de producto inmunopositivo que se detiene formando un par de bandas justo por encima de la banda del monómero. Antes de pasar a analizar la posible identidad de estas especies proteicas, descartamos de antemano que sea consecuencia del reconocimiento de otros mGluRs, ya que, como se ha apuntado en el apartado Material y Métodos, el

anticuerpo utilizado reconoce un epítipo localizado en el extremo carboxilo, específico de la isoforma 1a y no presenta reactividad cruzada con ninguna otra isoforma del receptor, ni con otros mGluRs.

La aparición de estas bandas en pesos moleculares ligeramente superiores al que corresponde al mGluR1a en conformación monomérica nos lleva a considerar dos posibilidades. Por un lado podría ser consecuencia de una movilidad electroforética reducida de la especie proteica y, por otro lado, puede deberse a la comigración de varias especies, completas o truncadas que se agregan y migran unidas.

Estudios de determinados complejos proteicos de membrana (de *Neisseria meningitidis*) han atribuido la aparición de bandas con un peso molecular de la proteína ligeramente superior al esperado a una menor movilidad electroforética debida a dos posibles causas, la no-ruptura de puentes disulfuro intramoleculares y/o a la relajación estructural inducida por temperatura. En ambos casos conduce a una menor movilidad a las moléculas y, como consecuencia, un peso molecular aparentemente mayor (Molinari y Helenius, 2002, Sánchez y cols., 2005).

En nuestro caso es difícil explicar la aparición de estas bandas por no-ruptura de puentes disulfuro intramoleculares, ya que, como hemos hecho referencia anteriormente, la susceptibilidad frente al agente reductor depende de la naturaleza del receptor y de la accesibilidad de los puentes disulfuro, y en nuestro caso ambos parámetros son iguales para toda la muestra. Entonces ¿podrían aparecer estas bandas como consecuencia de la temperatura? La carrera electroforética se debe realizar durante todo su proceso a una temperatura constante, evitando que los tampones circulantes se caliente por la propia conducción eléctrica. Para evitar el calentamiento es recomendable realizar la carrera "en frío" y para ello la práctica más frecuente es colocar la cubeta de electroforesis sobre hielo. Consideramos que esta práctica no es la más adecuada ya que a medida que transcurre la carrera, la temperatura va aumentando y las proteínas de menor migración son más susceptibles a sufrir procesos de relajación, deteniéndose a un peso molecular aparente superior al que les correspondería. Para evitar diferencia de movilidad migratoria producidos por cambios de temperatura hemos realizado, tanto la carrera electroforética, como

la transferencia proteica, en cámara fría, a una temperatura constante. No obstante, si en nuestro caso la temperatura hubiera afectado a la movilidad electroforética dando lugar a la aparición de las bandas de 150 y 160 kDa, también tendríamos que haber visto el mismo efecto y, además, en mayor medida, en la banda de 260 kDa que es la de menor migración.

Descartada la posibilidad de bandas artefactuales dependientes de la movilidad electroforética, analicemos la posible comigración de especies proteicas, ya mencionada en la sección Resultados como la opción más plausible. En cuanto a la posible participación de otras moléculas que justifiquen la aparición de estas bandas, podemos proponer varias opciones: agregados de formas truncadas, modificaciones postraduccionales y unión de otros ligandos al propio receptor.

Algunos estudios proteómicos (Dmitriev y cols., 2005) explican la aparición de este tipo de bandas como resultado de procesos de agregación entre formas truncadas de la proteína. En nuestro estudio, como ya se ha comentado anteriormente, hemos minimizado la probabilidad de agregación y además ésta es equiparable en ambas condiciones. En esta igualdad de condiciones en cuanto a la posibilidad de formación de agregados, ¿qué posibilidades hay de aparición de especies proteicas truncadas? A priori no podemos descartar la aparición de formas truncadas del receptor durante los procesos de homogenización y solubilización, pero, de ser así, es menos probable que aparezcan formas truncadas en condiciones nativas, donde el detergente tiene preferencia por las uniones lípido-lípido y lípido-proteína y permite una lisis suave, que en condiciones desnaturalizantes, donde utilizamos un detergente de carácter fuerte, con mayor apetencia por las interacciones interpeptídicas. Sin embargo, según nuestros resultados, la proporción de producto que se detiene en estas bandas no sólo no es menor en condiciones nativas (al menos para la de 160 kDa) sino que, además, es mayor que en condiciones desnaturalizantes.

Pero, además, suponiendo que la muestra contuviera formas truncadas, es poco probable que la totalidad de éstas se agregaran, de manera que las que se mantuvieran libres o desagregadas producirían bandas adicionales. Es decir, los truncados libres, derivados de monómeros, producirían señal en bandas de menor peso

molecular que la correspondiente el monómero-mGluR1a, y los derivados de los dímeros, aparecerían en bandas de menor peso molecular que la que corresponde al dímero. Es más, de todas las posibles formas truncadas sólo serían detectables aquellos truncados que retuvieran en su estructura el epítipo reconocido por el anticuerpo. Sin embargo, en nuestro estudio no detectamos ninguna banda de estas características. Por todo ello descartamos que la aparición de las bandas de 150 y 160 kDa sea consecuencia de especies truncadas.

Otra posible interpretación para la aparición de estas bandas intermedias, que ya mencionamos con anterioridad, es que resulten de la migración de monómeros-mGluR1a que arrastran en su estructura posibles modificaciones postraduccionales. Una de las modificaciones postraduccionales que descartamos es la palmitoilación. Apenas existen referencias bibliográficas en cuanto a la palmitoilación de mGluRs, y las pocas evidencias que hay, indican que, el mGluR1a, a diferencia de otros mGluRs, no sufre procesos de palmitoilación (Alaluf y cols., 1995a). Además, la falta de mención a restos palmitoílo en las bases de datos proteicas de UniProt confirman estas sospechas.

En cuanto a procesos de fosforilación y de glicosilación en los mGluRs aparecen más referencias en la literatura, y se conocen con exactitud los residuos susceptibles de ser fosforilados y glicosilados de la mayoría de ellos. El mGluR1a contiene dos sitios de fosforilación (en los residuos 672 y 1119) y cuatro de glicosilación (en los residuos 98, 223, 397 y 515). Mientras que algunos estudios previos atribuyen la banda de 150 kDa a la forma totalmente fosforilada del monómero-mGluR1a (Alaluf y cols., 1995b), otros la identifican como la forma monomérica glicosilada, demostrando que en presencia de N-glicosidasa F esta especie incrementa su migración hasta el peso molecular correspondiente al monómero sin glicosilar (Romano y cols., 1996b; Remelli y cols., 2008). Teniendo en cuenta estos argumentos, consideramos que la banda de 150 kDa que obtenemos corresponde al monómero-mGluR1a glicosilado, ya que nosotros no hemos utilizado glicosidasas en el procedimiento. Tampoco descartamos que este mismo monómero glicosilado esté simultáneamente fosforilado, ya que el bajo número de sitios de fosforilación que contiene, junto con el bajo peso

molecular de los restos fosfato, no pueden suponer un incremento del peso molecular lo suficientemente elevado como para ser detectado en otra banda. Otro argumento más para suponer que estos monómeros también están fosforilados es que en la solubilización hemos añadido inhibidores de fosfatasas, por lo que no hay razón para pensar que las fosfatasas endógenas los hayan podido desfosforilar.

Estos monómeros de 150 kDa no estarían localizados en la superficie celular como receptores activos, sino que estarían formando parte de una reserva intracelular, pero diferente del *pool* en *stand-by* que constituyen los monómeros de 140 kDa. Los monómeros de 150 kDa ya están parcialmente procesados y, por tanto, más disponibles para su reclutamiento a la superficie celular, formando parte de lo que podríamos considerar un *pool* o reservorio pre-activo.

CONCLUSIÓN: la banda de 150 kDa representa monómeros-mGluR1a glicosilados y probablemente fosforilados, que están localizados en el retículo endoplasmático formando parte del *pool* intracelular pre-activo.

Si el mGluR1a no sufre más modificaciones postraduccionales que las comentadas anteriormente ¿qué posible conformación del mGluR1a migra hasta la banda de los 160 kDa? Teniendo en cuenta la frecuencia de comigración de diferentes especies y/o complejos proteicos a la misma banda en los procedimientos electroforéticos (Krause, 2006), principalmente cuando la solubilización no es excesivamente agresiva, es posible que la banda que aparece con un peso molecular de 160 kDa pueda ser atribuida a una comigración de la forma monomérica del receptor unida a otra proteína; obviamente a alguno de sus habituales ligandos intracelulares de la densidad postsináptica. Son muchas las proteínas de la densidad postsináptica identificadas hasta la fecha (Shinohara, 2011) y, para algunas de estas proteínas se han descrito eventos de coimmunoprecipitación con mGluR1a (Brakeman y cols., 1997; Kato y cols., 1998; Sun y cols., 1998; Xiao y cols., 1998; Ciruela y cols., 1999; Naisbitt y cols., 1999; Shiraishi y cols., 1999; Kennedy, 2000; Xiao y cols., 2000; Boeckers y cols., 2002; Fagni y cols., 2002; Feng y cols., 2002; Choquet y Triller, 2003; Grant y cols., 2003; Sala y cols., 2003, 2005; Ehrenguber y cols., 2004; Petralia y cols.,

2005). De estos componentes de la densidad postsináptica, se ha demostrado que el mGluR1a establece una interacción, no sólo funcional, sino también una interacción física directa, con PSD-95, Shank, calmodulina, proteínas Homer y, evidentemente, con la proteína G (Hunt y cols., 1996; Kim y cols., 1996; Niethammer y cols., 1996; Dong y cols., 1997; Choquet y Triller, 2003; Ferraguti y cols., 2008). De estas posibles interacciones descartamos, de antemano, la migración ligada a cualquier isoforma de Shank, o a PSD-95, ya que su elevado peso molecular (160-240 kDa y 93 kDa) respectivamente (Ciruela y cols., 1999; Lim y cols., 1999; Naisbitt y cols., 1999) sobrepasaría con creces los 160kDa.

En cuanto a la calmodulina, su interacción con mGluR1a fue sugerida por la identificación, en el extremo carboxilo del mGluR1a, de una secuencia consenso de unión a calmodulina. Sin embargo, un reciente estudio demuestra que la calmodulina sólo interacciona específicamente con mGluR5 pero no con mGluR1a (Choi y cols., 2011). Dado que mGluR1a es un receptor acoplado a proteína G, ¿qué candidato más idóneo podría haber que la propia proteína G como co-partícipe de la banda de los 160 kDa? A pesar de ello, sin embargo, el peso molecular de la proteína G está próximo a los 90 kDa, dato difícil de conciliar con un peso total de 160 kDa y, además, la solubilización con detergentes suele resultar en la pérdida de las subunidades beta (7-9 kDa) y gamma (35-37 kDa) (Hamm y Gilchrist, 1996; Okamoto y cols., 2001). De este modo la única subunidad supuestamente ligada al monómero podría ser la subunidad alfa, pero ésta tiene un peso molecular de 45-47 kDa, demasiado elevado como para participar en la migración del mGluR1a a la banda de los 160 kDa.

Por tanto, tras el descarte de todas las anteriores, y dadas las evidencias de interacción del mGluR1a con las proteínas Homer, estas serían los mejores candidatos implicados en la migración del mGluR1a a la banda de los 160 kDa. La unión de las proteínas Homer al mGluR1a también es una interacción directa, no a través de otros ligandos, al extremo carboxilo del receptor (Brakeman y cols., 1997; Tu y cols., 1998, Kammermeier y cols., 2000; Ango y cols., 2000, 2001a, b; Kreienkamp, 2002a, b; Thomas, 2002; Moepps y Fagni, 2003; De Bartolomeis y Iasevoli, 2003; Nakamura y cols., 2004). Todas las proteínas adaptadoras Homer tienen un peso molecular de



aproximadamente 40 kDa, excepto Homer1a, conocido como la isoforma corta, y que tiene un peso molecular de 20,9 kDa, lo cual encaja perfectamente con la migración del complejo mGluR1a-Homer1a a la banda de los 160 kDa. Pero, además, un dato que apoya esta posibilidad es el hecho de que Homer1a es la única proteína Homer que se une al mGluR1a sin multimerizarse, mientras que el resto, conocidos como Homer largos, cuando están unidas al mGluR1a, aparecen formando complejos multiméricos de hasta seis subunidades, por lo que sería impensable que el resto de isoformas de Homer fueran responsables de esta banda. Por todo ello consideramos que Homer1a es, no sólo el candidato más favorable, sino el único posible para argumentar la aparición de la banda de los 160 kDa.

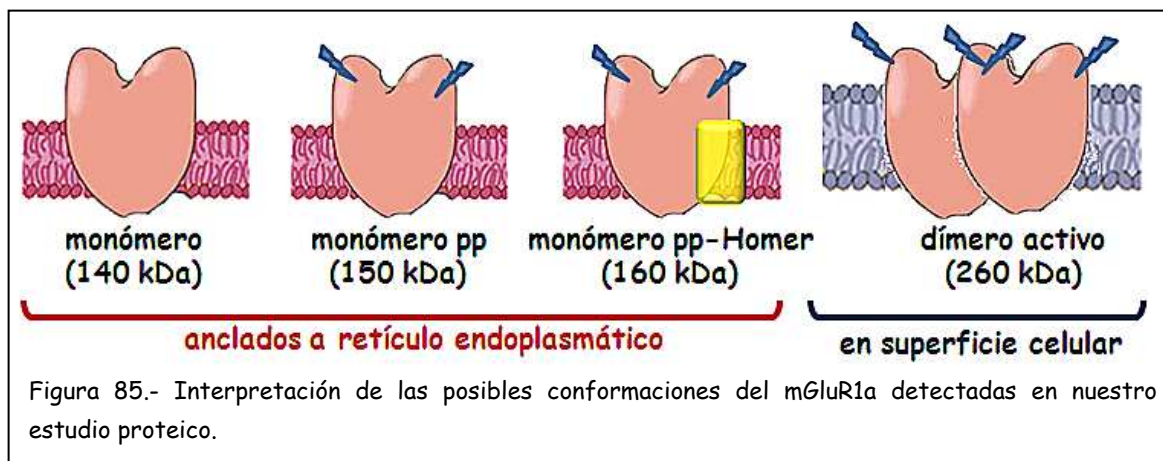
CONCLUSIÓN: la banda de los 160 kDa representa la expresión de complejos mGluR1a-Homer1a.

Todos los miembros de la familia Homer intervienen en el tráfico de mGluR1a (De Bartolomeis y Iasevoli, 2003; Ehrenguber y cols., 2004), pero existen numerosas controversias en los diferentes estudios en cuanto a la dirección de este tráfico. Incluso algunos autores sugieren que Homer1a apenas afecta a la distribución del mGluR1a (Roche y cols., 1999; Kammermeier y cols., 2000; Ango y cols., 2000; Coutinho y cols., 2001). Otros estudios apuntan que Homer1a interrumpe la unión del receptor a los Homer largos, evitando el secuestro intracelular de mGluR1a en el retículo endoplasmático y, por tanto, la unión con Homer1a aumenta la expresión del receptor en la superficie celular (Roche y cols., 1999; Ciruela y cols., 1999; Tadokoro y cols., 1999; Minami y cols., 2003, Ferragutti y cols., 2008). Por el contrario, otros estudios indican que la sobreexpresión de Homer1a reduce la expresión en superficie del mGluR1a y que las agrupaciones de mGluR1a en la membrana plasmática son inducidos por las formas largas de Homer (Sala y cols., 2003, 2005; Kammermeier, 2006; Shiraishi-Yamaguchi y Furuichi, 2007). Los resultados contradictorios obtenidos en estos estudios parecen ser consecuencia de diferentes metodologías, condiciones de ensayo y/o las diferentes líneas celulares utilizadas (De Bartolomeis y Iasevoli, 2003; Ehrenguber y cols., 2004).

Entendemos que los complejos mGluR1a-Homer1a detectados en la banda de 160 kDa, junto con los monómeros totalmente procesados detectados en la banda de los 150 kDa, dado que no son formas diméricas, no se localizan en la superficie celular, sino intracelularmente, anclados al retículo endoplasmático subyacente a la densidad postsináptica, y que también forman parte del *pool* intracelular de receptores que se intercambian desde y hacia la sinapsis. En relación a este *pool*, algunos estudios sugieren que un fondo de reserva activa del *pool* intracelular de receptores parece ser movilizado inmediatamente tras activación neuronal (Shi y cols., 1999; Park y cols., 2004; Triller y Choquet, 2005), y así, consideramos que estos monómeros representan un reservorio activo del *pool* intracelular que, a diferencia del reservorio en *stand-by*, estos monómeros ya están localizados en las proximidades de su destino, totalmente procesados, o ligados a las proteínas adaptadoras que van a regular su tráfico a la superficie celular.

No obstante, nuestros resultados no pueden asegurar definitivamente la identidad de estas especies proteicas, tanto de la banda de 150 kDa como la de 160 kDa, y serían necesarias otras estrategias para conocer la identidad de las moléculas que intervienen en la migración a estas bandas. A pesar de nuestras especulaciones, la identidad fehaciente de la proteína que comigra con mGluR1a a la banda de 160 kDa habría de ser identificada por medio de técnicas proteómicas complementarias a este estudio.

**CONCLUSIÓN:** los monómeros del mGluR1a, ya sean totalmente procesados o unidos a una proteína adaptadora, se localizan intracelularmente constituyendo un *pool* de reserva activo, que junto con el *pool* pre-activo, están disponibles para la inmediata demanda de receptores en superficie.



**De la expresión de los dímeros-mGluR1a en el aumento del inmunomarcado dendrítico en ausencia de estímulo sensorial:** A la luz de nuestros resultados, el aumento de expresión de la forma dimérica del mGluR1a es la consecuencia más llamativa de la deprivación sensorial olfatoria, ya que son los dímeros-mGluR1a los que más contribuyen al aumento de expresión del mGluR1a, siendo responsables de aproximadamente un 50% del aumento total detectado. Dado que esta conformación dimérica es la forma funcional del receptor localizado en la superficie celular, podemos confirmar que, del aumento total de expresión registrado inmunohistoquímicamente en el bulbo olfatorio deprivado, al menos el 50% se produce a nivel de la membrana plasmática y se traduce en un aumento de actividad.

El mGluR1a ha sido reiteradamente implicado en procesos de plasticidad sináptica (Bear y Malenka, 1994; Conquet y cols, 1994; Riedel, 1996; Bortolotto y cols., 1999a, b; Boeckers y cols., 2002; Liu y cols., 2004; Bellone y cols., 2008; Holbro y cols., 2009). La plasticidad sináptica supone la modificación de la eficacia de las sinapsis, modificando, entre otros parámetros, el número de receptores reclutados, así como su estado funcional y su interacción con otros componentes asociados de la densidad postsináptica (Choquet y Triller, 2003; Ward y cols., 2006; Enoki y cols., 2009; Shinohara y Hirase, 2009). La fluctuación de todos estos elementos en función de los cambios dependientes de la actividad neuronal conduce a una reorganización de las sinapsis, permitiendo la adaptación plástica de éstas a los cambios en el entorno (Sala y cols., 2001, 2003; Choquet y Triller, 2003).

Se ha demostrado que esta reorganización regula la morfología de la espina dendrítica (Choquet y Triller, 2003). En las zonas postsinápticas glutamatérgicas, cuando se sobreexpresan algunos de los componentes necesarios para establecer las condiciones óptimas de señalización para la actividad sináptica, se produce un ensanchamiento de las espinas dendríticas. Este ensanchamiento está mediado no sólo por el reclutamiento de receptores y otras moléculas, sino también por el reclutamiento y ensanchamiento de cisternas del retículo endoplasmático presentes en estas espinas dendríticas. Por el contrario, cuando se reduce la transmisión sináptica, las dimensiones y densidad de espinas se reduce (Sala y cols., 2001, 2003, 2005). Por estas y otras evidencias, la regulación del número de receptores postsinápticos se considera un parámetro clave de la plasticidad sináptica (Malinow y Malenka, 2002; Bredt y Nicoll, 2003; Triller y Choquet, 2005).

En función de nuestros resultados, podemos inferir que los cambios que hemos detectado en el sistema receptivo glutamatérgico forman parte de los fenómenos de plasticidad sináptica, que se desencadenan en el bulbo olfatorio privado para adaptarse a la falta de estimulación aferente glutamatérgica. Este mecanismo plástico de compensación, disparado para contrarrestar la caída de glutamato por la falta de aferencias glutamatérgicas, se traduce en un aumento de síntesis del mGluR1a que permite, fundamentalmente, una mayor exposición en superficie de estos receptores (ya que ésta es la fracción de receptor donde hemos detectado el mayor incremento de expresión). Esto supone un aumento de la capacidad receptiva a glutamato que pueda compensar la disminución de ligando derivada del descenso de actividad aferente. Además, una mayor densidad de receptores en superficie permitiría una mayor posibilidad de respuesta ante las descargas tipo *spillover* de glutamato y, por otro lado, una mayor probabilidad de que parte de estos receptores puedan mantener un cierto grado de actividad neuronal mediante su actividad constitutiva independiente de ligando.

**CONCLUSIÓN:** ante la falta de estimulación glutamatérgica, el bulbo olfatorio sufre una adaptación plástica incrementando la disponibilidad de receptores mGluR1a en la superficie celular.

Esta relación entre el aumento del número de receptores detectado en la banda de los dímeros y la regulación morfológica de los dominios sinápticos, concuerda con la aparente redistribución del mGluR1a a nivel celular que observamos en el estudio inmunohistoquímico, donde el aumento de marcaje para el mGluR1a tiene lugar principalmente en las dendritas. Por un lado observamos una mayor intensidad de marcaje en las dendritas positivas a mGluR1a en el bulbo olfatorio deprivado, y por otro, que la localización del receptor se puede apreciar en recorridos dendríticos más largos, incluso, en algunas ocasiones, se puede seguir el recorrido completo de la dendrita desde que surge del soma hasta alcanzar su destino. Además, los perfiles dendríticos tienen un aspecto más evidente, probablemente como consecuencia de los cambios morfológicos inducidos por la plasticidad sináptica, como ensanchamiento y expansión de las zonas sinápticas y la mayor presencia del receptor en la membrana plasmática. En este sentido, un dato llamativo, en contra de lo que parecía más probable de antemano, está relacionado con lo descrito en anteriores estudios de deprivación olfatoria en los que se sugiere que la reducción de volumen de la CPE, que se produce como consecuencia de la deprivación olfatoria, puede ser debida al encogimiento (*shrinkage*) de los procesos dendríticos que atraviesan esta capa (Brunjes, 1985). Esto parece contradecir la mayor apariencia con que observamos, al menos las dendritas de cM/Es. Por el contrario, nuestros resultados se ven apoyados por estudios más recientes que sugieren que esta reducción de la CPE no parece ser debida a procesos de degeneración ni de muerte neuronal (Hamilton y cols., 2008).

**CONCLUSIÓN:** el aumento de marcaje inmunohistoquímico para el mGluR1a en los procesos dendríticos y la mayor apariencia de estos procesos es consecuencia, principalmente, de una mayor expresión en la superficie celular del mGluR1a en conformación dimérica en el bulbo olfatorio deprivado.

**De la expresión del complejo mGluR1a-Homer1a en el aumento del marcaje inmunohistoquímico dendrítico en ausencia de estimulación aferente:** A la vista de los resultados del Westernblotting, otro aumento significativo de la expresión del mGluR1a es el que tiene lugar en la banda de 160 kDa. Hemos argumentado que esta especie corresponde al complejo mGluR1a-Homer1a y que representa parte del *pool* intracelular activo o en circulación del retículo endoplasmático, listo para dimerizar y ser conducido a la superficie celular. Este aumento parece ser también responsable del aumento del marcaje inmunohistoquímico que observamos en los procesos dendríticos del bulbo olfatorio privado.

Por un lado, es bien conocida la proximidad espacial de vesículas de retículo endoplasmático a las zonas de actividad sináptica en las dendritas, y que forma parte del denominado "aparato espinal" (*spine apparatus*) (Spacek, 1985; Spacek y Harris, 1997; Cooney y cols., 2002; Nakamura y cols., 2004). Diferentes estudios revelan que la distribución y conformación de este retículo endoplasmático están moduladas por la actividad neuronal y que sus cambios son cruciales en la plasticidad sináptica, proporcionando así un mecanismo para insertar nuevos receptores en la membrana plasmática según lo demande la actividad aferente. De hecho, se ha demostrado que tras la inducción de actividad sináptica (y sobreexpresión de proteínas adaptadoras como Shank y Homer), las cisternas tubulares y vesículas derivadas del retículo endoplasmático no sólo aumentan en número y se concentran alineadas con la densidad postsináptica, sino que, además, su superficie se expande y ensancha, contribuyendo a la dilatación dendrítica de las zonas postsinápticas activas (Broadwell y Cataldo, 1984; Fifkova y cols., 1983; Spacek y Harris, 1997; Villa y Meldolesi, 1994; Maletic-Savatic y cols., 1995; Banno y Kohno, 1996, 1998; Sala y cols., 2001, 2005; Deller y cols., 2003; Toresson y Grant., 2005; Grunditz y cols., 2008; Vlachos y cols., 2009).

Esta idea de una mayor presencia de retículo endoplasmático más elaborado en las zonas sinápticas es fácil de conciliar con la redistribución dendrítica del marcaje para mGluR1a que hemos observado en el estudio inmunohistoquímico. El aumento de expresión del complejo mGluR1a-Homer1a, anclados al retículo endoplasmático, junto con el mayor número y tamaño de cisternas del retículo endoplasmático concentradas

en las zonas sinápticas de la dendritas, son también responsables del aumento de marcaje inmunohistoquímico que observamos en el bulbo olfatorio deprivado. Como ya hemos comentado, este aumento de marcaje inmunohistoquímico es más apreciable en las partes distales de las dendritas, lo cual concuerda con el estudio de Spacek y Harris (1997) en el que se demuestra que este tipo de retículo endoplasmático se concentra principalmente en las partes distales de las dendritas y en las espinas dendríticas. Esto, además, explicaría por qué el aumento de marcaje inmunohistoquímico no sólo se detecta en el contorno celular de los procesos dendríticos, a nivel de la membrana plasmática como consecuencia del aumento de dímeros, sino también en el interior del cuerpo dendrítico (en el lumen de las dendritas) asociado al aumento de expresión del complejo monomérico que migra a la banda de los 160 kDa.

También hay que tener en cuenta que nuestros resultados muestran un pequeño aumento de la forma monomérica y glicosilada, un 0.62% de un total de 10.05%, que estaría también formando parte de este reservorio activo del *pool*/intracelular junto con el complejo mGluR1a-Homer1a, y que, asimismo, sería responsable del incremento de marcaje del interior dendrítico, aunque en menor medida.

Por otro lado, hay que añadir que estos resultados (el aumento de expresión del mGluR1a-Homer1a y del monómero-mGluR1a glicosilado en el retículo endoplasmático junto con el reclutamiento de cisternas de mayor volumen o más elaboradas en las regiones dendríticas en el bulbo deprivado), vuelven a estar en contraposición con que el *shrinkage* dendrítico sugerido por Brunjes (1985) tenga lugar en los árboles dendríticos de, al menos, las cM/Es.

En resumen, la plasticidad sináptica que se desencadena en el bulbo olfatorio ante la ausencia de estimulación sensorial, no sólo conduce a un aumento de expresión del mGluR1a, principalmente asociado a la membrana plasmática de las dendritas, sino que también se produce un incremento de su presencia en el interior de las mismas debido a su localización en la membrana del retículo endoplasmático localizado en los dominios dendríticos.

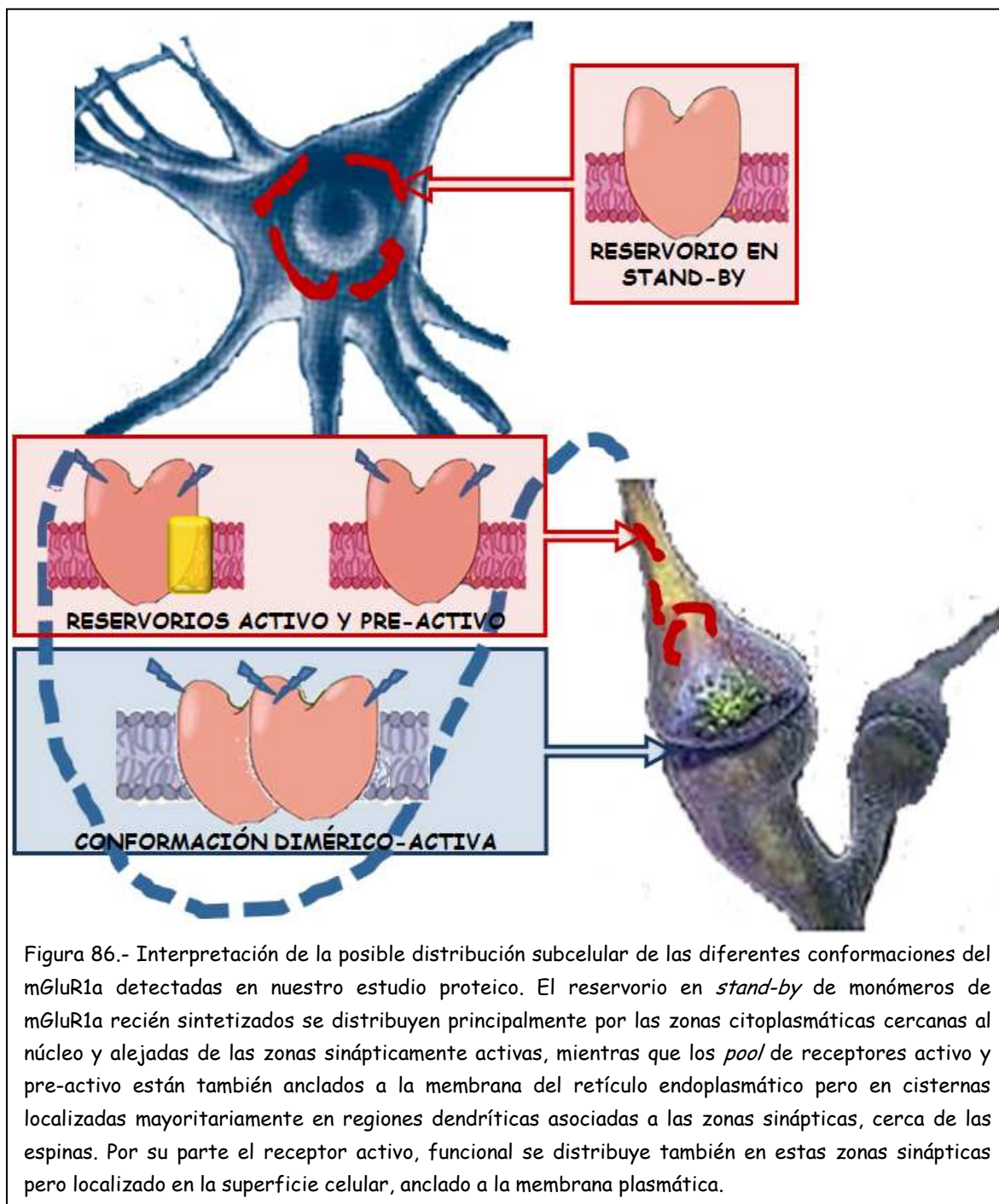
**CONCLUSIÓN:** el aumento de expresión del complejo mGluR1a-Homer1a y del mGluR1a en forma monomérica glicosilada también contribuyen al incremento de marcaje inmunohistoquímico en los procesos dendríticos y hace más evidente el perfil de las dendritas de las neuronas del bulbo olfatorio deprivado.

**De la expresión de monómeros-mGluR1a en el marcaje inmunohistoquímico de los somas neuronales en ausencia de estímulo sensorial:** Según los resultados del estudio proteómico, el aumento de expresión de los monómeros disociados (o no-acomplejados) correspondientes a la banda de 140, no es tan significativo como los anteriores, (1,23% de un total de 10.05%), sin embargo, esto no supone una menor importancia. Estos monómeros representarían la reserva en *stand-by* del *pool* intracelular, recién sintetizados en el retículo endoplasmático no asociado al aparato espinal. Este retículo endoplasmático, no asociado a sinapsis, se ha demostrado que es rugoso y se localiza predominantemente en el cuerpo celular y en las porciones proximales de las dendritas, a diferencia de las cisternas lisas de retículo asociadas a sinapsis, (Spacek y Harris, 1997). Por todo ello, podemos inferir que la expresión de estas formas del mGluR1a está relacionada principalmente con la expresión del mGluR1a que detectamos en los somas y regiones proximales de las dendritas.

Como hemos visto, el aumento de expresión del mGluR1a a nivel somático tiene lugar básicamente en la población de células yuxtglomerulares y de células horizontales de la CPI, mientras que en la población de células mitrales y empenachadas se mantiene aparentemente constante.

**CONCLUSIÓN:** el incremento del número de somas neuronales mGluR1a-inmunopositivos en la población de células yuxtglomerulares y de células de la CPI en el bulbo olfatorio deprivado es consecuencia principalmente del aumento de expresión de monómeros del mGluR1a recién sintetizados en el retículo endoplasmático.





### **Implicaciones funcionales**

Los sistemas sensoriales usan una gran variedad de mecanismos para amplificar estímulos externos débiles, aunque específicos. Por ejemplo, en el sistema auditivo, las propiedades mecánicas y moleculares de la cóclea hacen de ella un potente amplificador (LeMasurier y Gillespie, 2005). La capacidad del sistema olfatorio para detectar y discriminar odorantes en baja concentración sugiere que este sistema debe presentar, igualmente, mecanismos que le permitan amplificar las señales sensoriales aferentes. Esta amplificación, sin embargo, no parece que tenga lugar a nivel de las neuronas receptoras, fundamentalmente debido a la baja eficacia con la que estos receptores transducen la unión de un odorante en señales bioquímicas y eléctricas, (Takeuchi y Kurahashi, 2005; Bhandawat y cols., 2005). A pesar de esto, los odorantes inducen una tasa de actividad en las cM/Es que supera con creces la duración de la presentación del odorante en las neuronas receptoras olfatorias (Luo y Katz, 2001). Esta excitación prolongada de las cM/Es ante un estímulo es crítica para la amplificación del mismo.

Por otra parte, los sistemas sensoriales responden a los estímulos con actividades sinápticas rápidas, y de alta frecuencia. Sin embargo, la importancia de la velocidad de respuesta no es decisiva en el sistema olfatorio. En este caso, la correcta percepción y discriminación olfatoria viene, en gran medida, determinada por la actividad dinámica según un patrón espacio-temporal en la respuesta de diferentes elementos neuronales en el bulbo olfatorio. Así, la estimulación por parte de diferentes odorantes evoca un mapa topográfico de actividad glomerular en el bulbo, que genera un código espacial básico para la identificación de cada odorante concreto (Axel, 2005; Buck, 2005). Las células de proyección, cM/Es, responden a los odorantes con trenes de descargas de potenciales de acción que evolucionan temporalmente de manera específica para cada odorante, produciendo así un patrón temporal de excitación que contribuye a la identificación de cada odorante (Laurent y cols., 1996; Wilson y cols., 2004). Estas respuestas características de las cM/Es son posibilitadas, y moduladas, por relaciones sinápticas tales como la inhibición lateral (Lagier y cols., 2004) o por interacciones excitatorias intraglomerulares mediada por

distintos tipos de neuronas no principales (Schoppa y Westbrook, 2001; Christie y Westbrook, 2006). El desencadenamiento de este mecanismo postsináptico depende inicialmente, de manera crítica, del tiempo de duración de la excitación de las cM/Es inducida por los estímulos aferentes. De este modo, tanto para conseguir la amplificación del estímulo sensorial olfatorio, como para permitir el desarrollo de un patrón topográfico de excitación a nivel glomerular característico para cada odorante, es necesaria, en primer lugar la excitación mantenida de las cM/Es como respuesta a la estimulación sensorial.

En efecto, se ha demostrado que la estimulación puntual de los aferentes sensoriales evoca una despolarización muy duradera en las cM/Es (Schoppa y Westbrook, 2001). Aunque esta despolarización es abolida por antagonistas de receptores AMPA y NMDA (Schoppa y Westbrook, 2001; De Saint Jan y Westbrook, 2005), la duración del potencial excitatorio postsináptico, en ausencia de antagonistas, excede enormemente incluso al lento potencial excitatorio inducido por receptores NMDA en otros sistemas. Este dato sugiere que esta elevada duración de la despolarización debe estar mediada por otro elemento adicional. En la mayor parte de las sinapsis excitatorias, un simple estímulo evoca una corta liberación de glutamato que activa los receptores AMPA y provoca una corta despolarización (Clements y cols., 1992). Como consecuencia de ésta se produce la activación de los receptores NMDA de alta afinidad, que median una corriente lenta dependiente de voltaje, que raramente excede unos cientos de milisegundos (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004). La presencia de mGluR1a, sin embargo, se ha demostrado que induce la generación de corrientes postsinápticas mucho más largas, que llegan incluso a durar varios segundos (Anwyl, 1999).

Como hemos demostrado, existe una alta tasa de expresión de mGluR1a en las dendritas apicales tanto de cM/Es como en una población específica de células yuxtglomerulares, lo cual, junto con los datos previos, erige a este receptor como elemento decisivo en este proceso. Aun así, el potencial postsináptico excitatorio mediado por mGluR1a sólo se desencadenaría tras una estimulación presináptica de alta frecuencia o tras el bloqueo de los transportadores de glutamato. Dicho de otro

modo, para que tenga lugar la activación de mGluR1a se requieren unas condiciones que faciliten el *spillover* de glutamato y, por tanto, el acceso de este neurotransmisor a los lugares perisinápticos donde se dispone el receptor mGluR1a (Huang y cols., 2004; De Saint Jan y Westbrook, 2005; Yuan y Knopfel 2006).

Respuestas sinápticas excitatorias de larga duración han sido observadas en sinapsis con características ultraestructurales especiales. Por ejemplo, en las sinapsis gigantes del cerebelo entre las fibras musgosas y las células unipolares, la arquitectura sináptica facilita el retardo en la eliminación de glutamato, incrementando así la duración del potencial postsináptico excitatorio varios segundos (Rossi y cols., 1995). De modo análogo, los glomérulos olfatorios presentan una arquitectura sináptica que presenta peculiaridades idóneas para facilitar la acumulación de glutamato y permitir así la activación de mGluR1a. En primer lugar, los terminales de los axones de las neuronas receptoras olfatorias, cuya excitación conlleva la liberación de glutamato, están frecuentemente agrupados a lo largo de dendritas, por lo que se localizan cerca de sinapsis dendrodendríticas, donde también se libera glutamato (Montague y Greer, 1999). Por otra parte, no suele haber procesos gliales entre botones terminales del nervio olfatorio contiguos (Kasowski y cols., 1999), pero, aunque pueden aparecer ocasionalmente entre sinapsis axodendríticas y dendrodendríticas, esta supuesta barrera a la difusión de glutamato sería fácilmente sobrepasada (De Saint Jan y Westbrook, 2005). Así, los glomérulos olfatorios presentan compartimentos libres de glía que constituyen las vías principales para la libre difusión del glutamato liberado (Kasowski y cols., 1999).

De este modo la estimulación del nervio olfatorio provoca dos procesos de liberación de glutamato en intervalos cortos (1-2 ms) dentro de un glomérulo ("respuesta disináptica") (De Saint Jan y Westbrook, 2005). El primero está mediado por la liberación de glutamato desde los terminales del nervio olfatorio, y el segundo refleja la consecuencia del primero, liberándose glutamato desde las dendritas de cM/Es consecuente al *input* excitatorio inicial (Christie y Westbrook, 2006). Estos dos mecanismos iniciales de liberación de glutamato contribuyen a la saturación de los transportadores de glutamato, los cuales, en principio, limitarían su difusión (Christie

y Westbrook, 2006) impidiendo la posible activación del mGluR1a (Yuan y Knopfel, 2006). Sin embargo, una vez los transportadores se han saturado debido a la masiva liberación del neurotransmisor, estas dos fuentes de glutamato serían las responsables de la activación de mGluR1a.

Diferentes estudios señalan que en los glomérulos se pueden sincronizar las descargas de cM/Es en un amplio rango de escalas de tiempo que van desde los segundos hasta los milisegundos (Schoppa y Westbrook, 2001, 2002), demostrándose la implicación del mGluR1a en la generación de la excitación sináptica de larga duración en las cM/Es a través de estas respuestas disinápticas (De Saint Jan y Westbrook, 2007). Así, estos receptores son decisivos para la aparición de respuestas excitatorias postsinápticas de larga duración en las cM/Es que permiten amplificar la información sensorial aferente e imponer un patrón temporal de actividad específico en el bulbo olfatorio que posibilita la discriminación olfatoria.

En este contexto, la presencia de poblaciones neuronales positivas a mGluR1a en los glomérulos podrían estar implicadas en la generación de actividades oscilatorias, posibilitando una función temporal para sincronizar, inicialmente, poblaciones interneuronales (excitatorias e inhibitorias) y así, indirectamente, sincronizar la actividad de los diferentes grupos de cM/Es. Estas actividades sincrónicas han sido claramente demostradas en el bulbo olfatorio y parecen responsables de la codificación espacio-temporal de la información olfatoria (Laurent, 1996). Por tanto, según este modelo, el mGluR1a constituye un importante componente de los elementos de la circuitería glomerular para explicar la actividad oscilatoria en la sincronización odorante-específica de las neuronas observada en el bulbo olfatorio.

Las poblaciones interneuronales responsables de la dirección y sincronización de la respuesta coordinada de esta circuitería glomerular podrían ser ciertas poblaciones de células empenachadas como las cEEs y cESs, que son altamente excitables (Hayar y cols., 2004) y expresan mGluR1a, como hemos demostrado. Las interacciones dendríticas intraglomerulares entre cM/Es y las cEEs y cESs parecen jugar un importante papel en el modelado de la representación de la información olfatoria, tal

como la amplificación de la aferencia sensorial y la sincronización de patrón temporal de disparo de las cM/Es (Wachowiak and Shipley, 2006).

Aunque el mecanismo que dirige esta actividad rítmica en los circuitos glomerulares se desconoce, en el origen de la misma las cEEs y cESs son los candidatos más probables, entre otras razones porque: i) estas neuronas son glutamatoceptivas y glutamatérgicas y reciben contactos sinápticos directos por parte de los axones de las NROs, ii) disparan en forma de espigas de potenciales de acción de frecuencias específicas, y iii) establecen sinapsis excitatorias con otras cEEs y cESs y con las propias cM/Es (Hayar y cols., 2004a,b; Liu y Shipley, 2008; Ma y Lowe, 2010). Además, se ha comprobado que estas neuronas son capaces de generar una actividad "marcapasos" que puede propagarse por todo el glomérulo, produciendo potenciales de acción que sincronizan el patrón de descargas generadas por el conjunto de cM/Es de cada glomérulo. Es importante el que las cEEs y cESs pueden activar cM/Es mediante contactos excitatorios, y ciertas observaciones demuestran que la actividad coordinada de esta red provoca el disparo sincronizado de grupos de cM/Es (De Saint Jan y cols., 2009).

Los *inputs* sensoriales evocan descargas en las cEEs y cESs y, como hemos visto, subsecuentemente en la población de cM/Es. A través de este mecanismo se posibilita la amplificación de *inputs* débiles y se asegura la activación sincrónica de cM/Es dentro de cada glomérulo. De hecho, las cEEs y cESs se erigen en serios candidatos a dirigir estos procesos porque, aunque las dendritas de cM/Es han sido consideradas clásicamente como las principales dianas de los axones de las NROs, los impulsos débiles activan preferentemente a las cEEs y cESs debido a su bajo umbral de excitación. Este bajo umbral de excitabilidad es una propiedad posibilitada por la gran cantidad de canales activados por voltaje con umbrales muy bajos de apertura que presentan en relación con otras neuronas bulbares. Estos canales permiten una persistente y elevada conductancia para el Na<sup>+</sup> que es, además, potenciada por una alta conductancia al Ca<sup>2+</sup> determinada por canales iónicos sensibles a mínimos cambios del potencial de membrana (Hayar y cols., 2004b; Liu y Shipley, 2008). A todo esto hay que añadir que los axones de las NROs podrían establecer un mayor número de

sinapsis sobre cEEs y cESs que sobre las propias cM/Es, y se ha comprobado, efectivamente, que las primeras son capaces de responder a estímulos débiles que no llegan a superar el umbral de despolarización de las cM/Es. Por tanto, aunque las dianas de sus axones no se conocen con exactitud, las cEEs y cESs podrían, incluso, constituir una vía de señalización independiente de la clásica constituida por cM/Es (Wachowiak and Shipley, 2006).

Por otra parte, en la imposición de un patrón oscilatorio de disparo característico para las cM/Es intervendrían, junto con las actividades rítmicas excitatorias posibilitadas por las cEEs y cESs, mecanismos inhibitorios, cuya combinación coordinada con los anteriores facilitaría la actividad acompañada de las células principales. Aunque en este último caso los datos bibliográficos son prácticamente inexistentes, la presencia de células horizontales mGluR1a-positivas en la CPI, que no son glutamatérgicas (no detectamos expresión de VGLUT2) y que, como la práctica totalidad de cPAC son probablemente inhibitorias, las erigiría en un posible candidato para participar en este proceso. En este sentido, estas neuronas se encuentran en un lugar estratégico para recibir contactos glutamatérgicos por parte de los axones de cM/Es y, por otra parte, su axón proyecta específicamente a la zona glomerular (Eyre y cols., 2008, 2009). Sería plausible, por tanto, pensar que la activación del mGluR1a presente en estas neuronas, provocaría en ellas una excitación prolongada, que, a su vez, produciría una inhibición en determinados elementos a nivel glomerular. La combinación coordinada de esta actividad inhibitoria junto con la excitatoria posibilitada por la actividad de cEEs y cESs contribuiría al establecimiento más definido del patrón rítmico de disparo de las cM/Es.

El significado que pueda tener el incremento en la expresión de mGluR1a en las dendritas tanto de cM/Es como en las de cEEs y cESs debería ser considerado a través de la activación de mecanismos dependientes de  $Ca^{2+}$  (Heidinger y cols., 2002), que mediarían efectos pro-excitatorios tales como incrementos en la liberación de glutamato (Strasser y cols., 1998), incremento de la excitabilidad neuronal (Mills y cols., 2001a), e incrementos de las corrientes mediadas por receptores NMDA (Fitzjohn y cols., 1996) que perseguirían la compensación de la pérdida de

estimulación aferente, posibilitando un menor umbral en la excitabilidad neuronal a nivel glomerular ante estímulos débiles y potenciando la coordinación sincrónica del disparo de las cM/Es.

De especial interés es el efecto sinérgico que tiene lugar entre mGluR1a y los receptores ionotrópicos de glutamato, especialmente con los de tipo NMDA, a nivel glomerular. La señalización glutamatérgica a través de los receptores NMDA es esencial en el control de un amplio abanico de procesos, desde el desarrollo neural hasta la plasticidad sináptica. Algunas formas de plasticidad sináptica están asociadas a cambios rápidos en la población de receptores de glutamato en el elemento postsináptico. De hecho los receptores NMDA resultan críticos a la hora de disparar modificaciones sinápticas, y cambios en la expresión de estos receptores podrían tener un amplio efecto sobre diversas modalidades de plasticidad sináptica (Quinlan y cols., 1999).

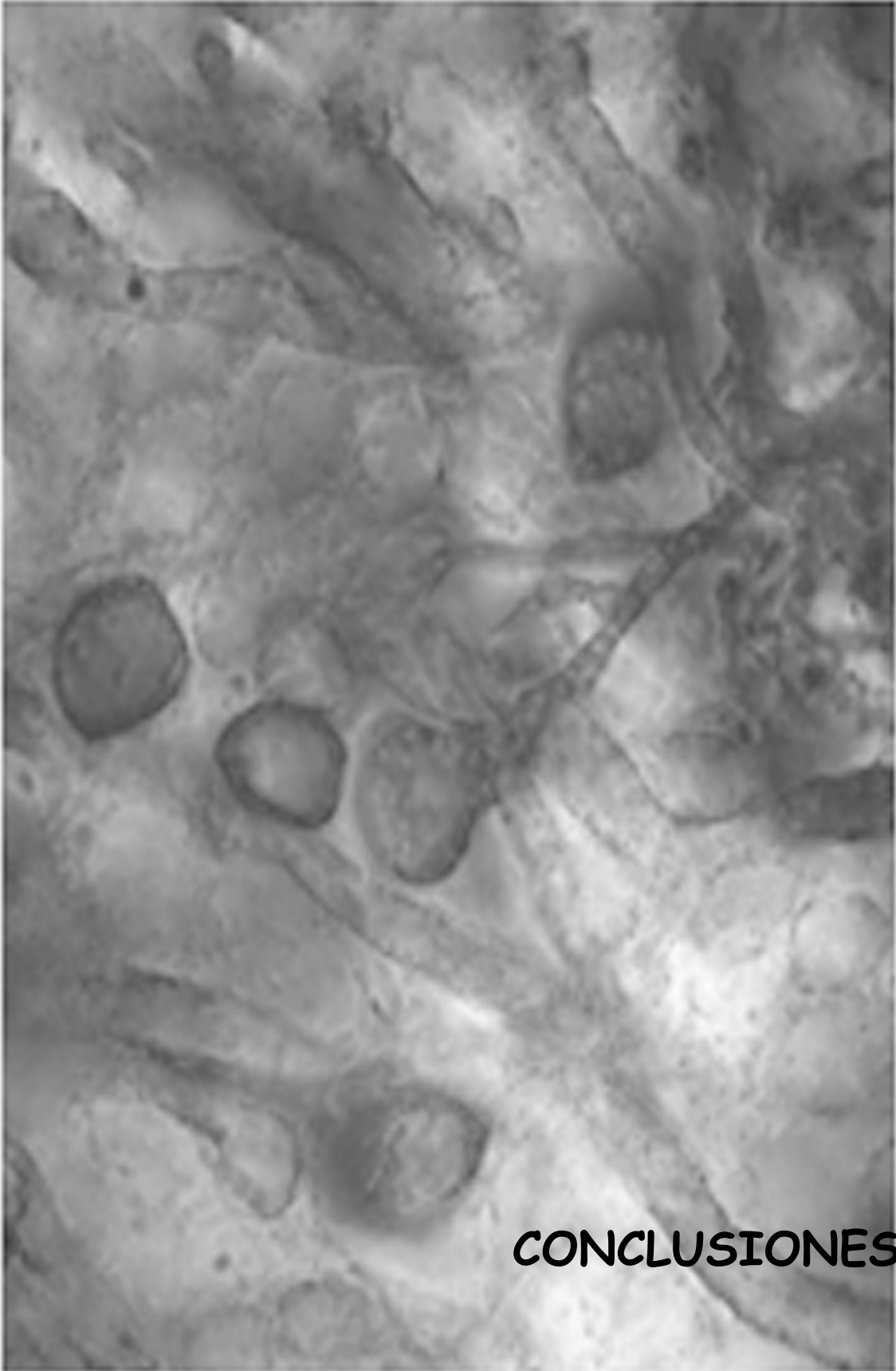
Una forma inmediata de modulación de receptores NMDA es mediada por la actividad postsináptica de mGluR1a (Lan y cols., 2001; Skeberdis y cols., 2001; Heidinger y cols., 2002), que en los circuitos neuronales que nos ocupan, colocalizan en la periferia de la región postsináptica (Baude y cols., 1993; Lujan y cols., 1997). Además de su proximidad, ambos tipos de receptores están estructuralmente ligados a través de un complejo andamiaje molecular. El mGluR1a posee un dominio carboxi-terminal largo que le permite unirse a diferentes miembros de la familia Homer, quienes, a su vez, lo unen a receptores NMDA y AMPA a través de proteínas Shank, así como a otras moléculas de señalización como PLC y PKC (Tu y cols., 1999). Este entramado proteico proveería de un posicionamiento estratégico en consonancia con la regulación de los receptores NMDA por parte de mGluR1a. De hecho, la activación de mGluR1a provoca un incremento rápido del número de receptores NMDA funcionales (Lan y cols., 2001) y, mediante el control de los niveles basales de fosforilación de las subunidades NR2 (del receptor NMDA), mGluR1a puede también regular la tasa de reciclaje del mismo, incrementando así el número de receptores NMDA funcionales en la sinapsis (Vissel y cols., 2001).



La composición de subunidades de los receptores NMDA en el bulbo olfatorio mantiene las características del SNC inmaduro (Sun y cols., 2000) en el que predominan los transcritos de NR2B frente a los de NR2A, y existe una elevada expresión de NR2D. Tanto NR2B como NR2D son subunidades de elevada expresión en el periodo embrionario tardío y estadios perinatales (Monyer y cols., 1994; Zhong y cols., 1995; Dunah y cols., 1996; Wenzel y cols., 1996). La presencia de estas subunidades en los complejos NMDA postsinápticos provoca un aumento de la duración de la corriente excitatoria mediada por ellos (Ishii y cols., 1993; Monyer y cols., 1994; Wenzel y cols., 1996; Li y cols., 1998). De acuerdo con esto, las sinapsis glutamatérgicas en la CGL se caracterizan por una corriente de larga duración mediada por el receptor NMDA (Aroniadou-Anderjaska y cols., 1997, 1999a, b) que, junto con la inducida por la actuación de mGluR1a, podrían jugar un importante papel posibilitando la funcionalidad de las conexiones que se encuentran en constante renovación en el bulbo olfatorio adulto (Aroniadou-Anderjaska y cols., 1999a, b). Además, este particular componente excitatorio tan prolongado, dependiente del receptor NMDA y de mGluR1a, puede jugar un papel decisivo en la salida de información del bulbo olfatorio, ya que provoca descargas prolongadas y sincrónicas de las células de proyección. El componente NMDA de la respuesta de cM/Es a la estimulación del nervio olfatorio puede amplificar la salida del bulbo, y así facilitar la integración y plasticidad sináptica (Aroniadou-Anderjaska y cols., 1997). En la facilitación de estos fenómenos tan particulares, en condiciones fisiológicas, está implicado el mGluR1a (Lan y cols., 2001; Vissel y cols., 2001), el cual, mediante las modificaciones en su expresión podría constituir la base para incrementar, o para añadir, mecanismos regulatorios que disparen los procesos dirigidos a desencadenar, permitir, o facilitar, cambios plásticos adaptativos en función de los requerimientos determinados por las características ambientales.

Aunque para corroborar definitivamente las conclusiones a las que hemos llegado con la presente Tesis Doctoral, se necesitarían estudios complementarios, sobre todo de tipo electrofisiológico, en función de nuestros resultados podemos inferir que los cambios detectados en el sistema receptivo glutamatérgico forman parte de procesos

de plasticidad sináptica que se desencadenan en el bulbo olfatorio privado como mecanismos adaptativos a la falta de estimulación glutamatérgica aferente. Este mecanismo plástico de compensación se traduce, inicialmente a nivel molecular, en un aumento de síntesis y redistribución de mGluR1a que permite, fundamentalmente, una mayor exposición en superficie de receptores funcionales. Esta plasticidad a nivel molecular tiene una consecuencia plástica a nivel fisiológico ya que estas modificaciones suponen un aumento de la capacidad receptiva a glutamato que pudiera compensar la disminución de la cantidad de ligando, y, cuando menos, el mantenimiento de cierto grado de actividad, debido a la actividad constitutiva independiente de ligando que posee el mGluR1a. Finalmente, la mayor tasa de expresión de mGluR1a posibilitaría aumentar, de modo notablemente superior a lo que ocurre en condiciones normales, la duración de la excitación de las cM/Es, proporcionando así un mecanismo a través del cual se incrementa la capacidad de amplificación y discriminación de posibles señales olfatorias aferentes.

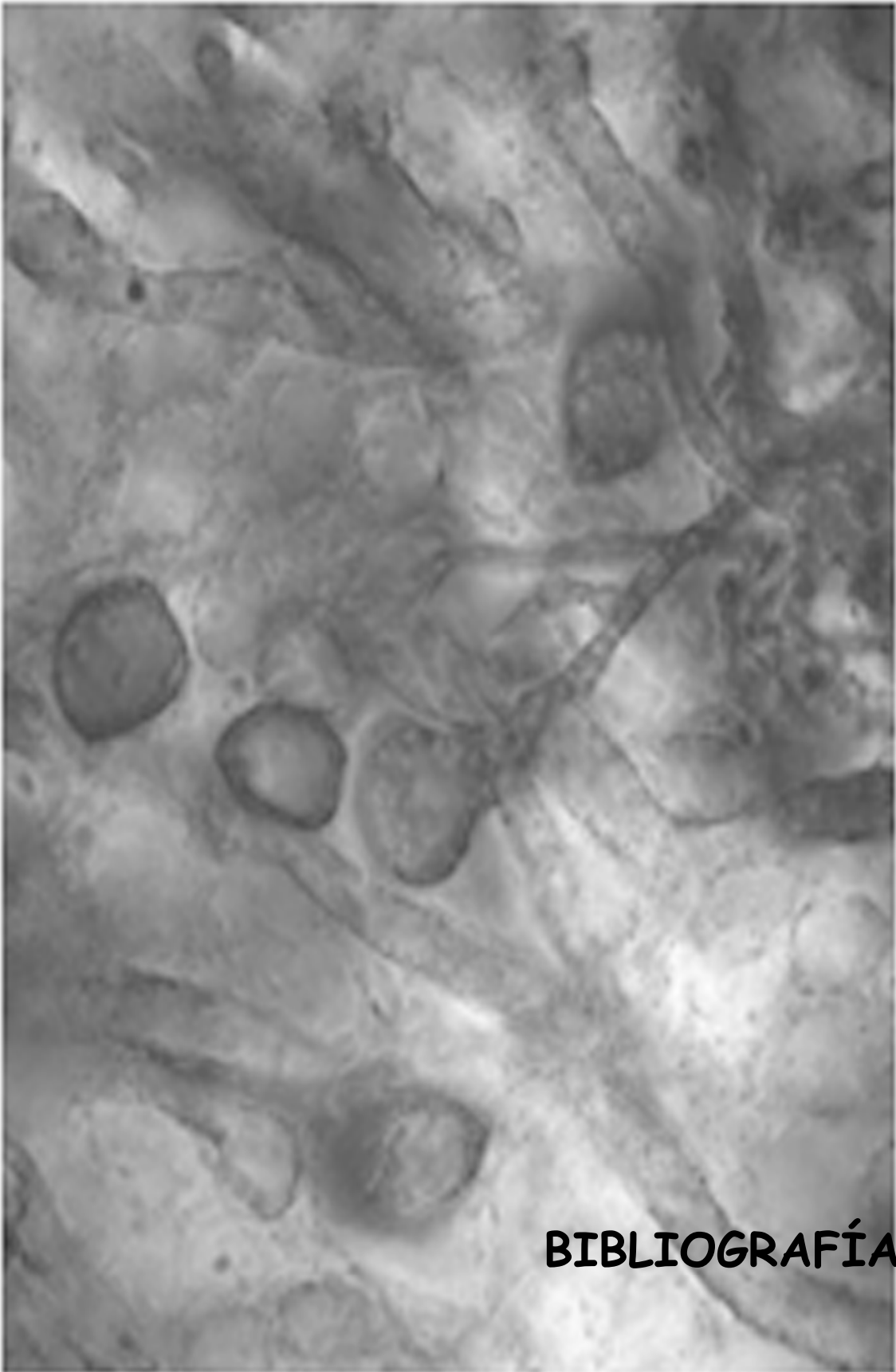


**CONCLUSIONES**

- 1.- El mGluR1a en el bulbo olfatorio se expresa en la mayor parte de las neuronas de proyección: en la totalidad de las células mitrales y en la mayor parte de las células empenachadas. La presencia del receptor en estas poblaciones neuronales sugiere su participación en eventos comunes a la fisiología de éstas, relacionados con la transmisión del estímulo olfatorio a centros superiores de la vía. En concreto, el mGluR1a parece intervenir en la generación de ondas de despolarización inusualmente largas en las cM/Es que posibilita la amplificación del estímulo olfatorio.
  
- 2.- Subpoblaciones interneuronales que comprenden células empenachadas externas, células periglomerulares y células horizontales de la capa plexiforme interna, que inervan específicamente la capa glomerular, también expresan el mGluR1a. Este receptor, por tanto, aparece relacionado con estirpes neuronales implicadas en la modulación de la información olfatoria a nivel glomerular. La activación de mGluR1a en estas poblaciones neuronales inducirá la generación de ritmos excitatorios e inhibitorios que determinarán una actividad sincrónica definida para las cM/Es de un mismo glomérulo. Este mecanismo permitiría el establecimiento de patrones temporales de actividad, característicos en los diferentes glomérulos, y que son responsables de la correcta discriminación olfatoria
  
- 3.- La mayoría de las neuronas que expresan mGluR1a y son, por tanto, glutamatoceptivas, coexpresan VGLUT2. Este hecho nos ha permitido describir, por vez primera, una población de células periglomerulares glutamatérgicas. Éstas son elementos postsinápticos a los axones de las neuronas receptoras olfatorias, por lo que pertenecen a células periglomerulares de tipo I. Además, dentro de este tipo, constituirían un subgrupo glutamatérgico, no solapado con los dos grandes grupos descritos hasta el momento, GABAérgico y GABAérgico/dopaminérgico.

4.- La privación olfatoria unilateral neonatal provoca un incremento de la expresión de mGluR1a, que se traduce en la detección de nuevos elementos neuronales positivos en la capa glomerular. A su vez, tiene lugar una redistribución del receptor, localizándose en dominios dendríticos donde no se expresa en condiciones control. En estas condiciones, el mayor incremento del receptor tiene lugar en su forma dimérica, que representa la forma anclada a membrana plasmática y, por tanto, activa. Junto con esto, se produce un aumento de la expresión de formas monoméricas en diferentes etapas de maduración postraduccional, que se encuentran ancladas a la membrana del retículo endoplasmático como paso previo a adquirir la conformación dimérica activa, disponibles para la inmediata demanda de receptores en superficie.

**Conclusión final:** Los resultados presentados en esta memoria nos permiten concluir que el sistema receptivo glutamatérgico, mediado por mGluR1a, representa un elemento decisivo en la consecución de la correcta recepción de señales olfatorias. La ausencia de actividad sensorial aferente y, por tanto, de estimulación glutamatérgica, desencadena en este sistema mecanismos adaptativos de plasticidad. Éstos se traducen, inicialmente, a nivel molecular, en un aumento de síntesis y redistribución de mGluR1a que permite una mayor exposición en superficie de receptores funcionales. Esta plasticidad a nivel molecular tiene una consecuencia a nivel fisiológico, ya que estas modificaciones suponen un aumento de la capacidad receptiva a glutamato que pudiera compensar la disminución de la cantidad de ligando, y, cuando menos, el mantenimiento de cierto grado de funcionalidad, debido a la actividad constitutiva independiente de ligando que posee el mGluR1a. Finalmente, la mayor tasa de expresión de mGluR1a posibilitaría aumentar la duración de la despolarización de las cM/Es, proporcionando así un mecanismo a través del cual se incrementa la capacidad de amplificación y discriminación de señales olfatorias aferentes.



- Abe T, Sugihara H, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. (1992). Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca<sup>2+</sup> signal transduction. *J Biol Chem.* 267:13361-13368.
- Ahmed SN, Brown DA, London E. (1997). On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry.* 36:10944-10953.
- Aiba A, Kano M, Chen C, Stanton ME, Fox GD, Herrup K, Zwingman TA, Tonegawa S. (1994a). Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell.* 79:377-388.
- Aiba A, Chen C, Herrup K, Rosenmund C, Stevens CF, Tonegawa S. (1994b). Reduced hippocampal long-term potentiation and context-specific deficit in associative learning in mGluR1 mutant mice. *Cell.* 79:365-375.
- Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H, Yamada Y, Inoue I, Kojima I, Takeda J. (2000). Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem.* 74:2622-2625.
- Al-Tubuly AA. (2000). SDS-PAGE and Western Blotting. *Methods Mol Med.* 40:391-405.
- Alagarsamy S, Sorensen SD, Conn PJ. (2001). Coordinate regulation of metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 11:357-362.
- Alaluf S, Mulvihill ER, McIlhinney RA. (1995a). The metabotropic glutamate receptor mGluR4, but not mGluR1 alpha, is palmitoylated when expressed in BHK cells. *J Neurochem.* 64:1548-1555.
- Alaluf S, Mulvihill ER, McIlhinney RA. (1995b). Rapid agonist mediated phosphorylation of the metabotropic glutamate receptor 1 alpha by protein kinase C in permanently transfected BHK cells. *FEBS Lett.* 367:301-305.
- Alonso JR, Porteros A, Crespo C, Arévalo R, Briñón JG, Weruaga E, Aijón J. (1998). Chemical anatomy of the macaque monkey olfactory bulb: NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase activity. *J Comp Neurol.* 402:419-434.
- Alonso JR, Briñón JG, Crespo C, Bravo IG, Arévalo R, Aijón J. (2001). Chemical organization of the macaque monkey olfactory bulb: II. Calretinin, calbindin D-28k, parvalbumin, and neurocalcin immunoreactivity. *J Comp Neurol.* 432:389-407.
- Altman J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 137:433-457.
- Ango F, Pin JP, Tu JC, Xiao B, Worley PF, Bockaert J, Fagni L. (2000). Dendritic and axonal targeting of type 5 metabotropic glutamate receptor is regulated by homer1 proteins and neuronal excitation. *J Neurosci.* 20:8710-8716.
- Ango F, Prézeau L, Muller T, Tu JC, Xiao B, Worley PF, Pin JP, Bockaert J, Fagni L. (2001a). Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature.* 411:962-965.

- Ango F, Pin JP, Tu JC, Xiao B, Worley PF, Bockaert J, Fagni L. (2000b). Dendritic and axonal targeting of type 5 metabotropic glutamate receptor is regulated by homer1 proteins and neuronal excitation. *J Neurosci*. 20:8710-8716.
- Anwyl R. (1991). The role of the metabotropic receptor in synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci*. 12:324-326.
- Aramori I, Nakanishi S. (1992). Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron*. 8:757-765.
- Armstrong N, Sun Y, Chen GQ, Gouaux E. (1998). Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature*. 395:913-917.
- Aroniadou-Anderjaska V, Ennis M, Shipley MT. (1997). Glomerular synaptic responses to olfactory nerve input in rat olfactory bulb slices. *Neuroscience*. 79:425-434.
- Aroniadou-Anderjaska V, Ennis M, Shipley MT. (1999a). Current-source density analysis in the rat olfactory bulb: laminar distribution of kainate/AMPA- and NMDA-receptor-mediated currents. *J Neurophysiol*. 81:15-28.
- Aroniadou-Anderjaska V, Ennis M, Shipley MT. (1999b). Dendrodendritic recurrent excitation in mitral cells of the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol*. 82:489-494.
- Aroniadou-Anderjaska V, Zhou FM, Priest CA, Ennis M, Shipley MT. (2000). Tonic and synaptically evoked presynaptic inhibition of sensory input to the rat olfactory bulb via GABA(B) heteroreceptors. *J Neurophysiol*. 84:1194-1203.
- Astic L, Saucier D. (2001). Neuronal plasticity and regeneration in the olfactory system of mammals: morphological and functional recovery following olfactory bulb deafferentation. *Cell Mol Life Sci*. 58:538-545.
- Aungst JL, Heyward PM, Puche AC, Karnup SV, Hayar A, Szabo G, Shipley MT. (2003). Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature*. 426:623-629.
- Axel R. (2005). Scents and sensibility: a molecular logic of olfactory perception. *Angew Chem Int Ed Engl*. 44:6110-6127.
- Bai M, Trivedi S, Brown EM. (1998). Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem*. 273:23605-23610.
- Baker H, Kawano T, Margolis FL y Joh TH. (1983). Transneuronal regulation of tyrosine hydroxylase expression in olfactory bulb of mouse and rat. *J Neurosci*. 3:69-78.
- Baker H, Towle AC, Margolis FL. (1988). Differential afferent regulation of dopaminergic and GABAergic neurons in the mouse main olfactory bulb. *Brain Res*. 450:69-80.
- Baker H. (1990). Unilateral, neonatal olfactory deprivation alters tyrosine hydroxylase expression but not aromatic amino acid decarboxylase or GABA immunoreactivity. *Neuroscience*. 36:761-771.
- Baker H, Farbman AI. (1993). Olfactory afferent regulation of the dopamine phenotype in the fetal rat olfactory system. *Neuroscience*. 52:115-134.



- Baker H, Morel K, Stone DM y Maruniak JA. (1993). Adult naris closure profoundly reduces tyrosine hydroxylase expression in mouse olfactory bulb. *Brain Res.* 614:109-116.
- Bailey MS, Shipley MT. (1993). Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *J Comp Neurol.* 328:501-526.
- Baltanás FC, Curto GG, Gómez C, Díaz D, Murias AR, Crespo C, Enderly F, Szabó G, Alonso JR, Weruaga E. (2011). Types of cholecystokinin-containing periglomerular cells in the mouse olfactory bulb. *J. Neurosci. Res.* 89:35-43
- Banno T, Kohno K. (1996). Conformational changes of smooth endoplasmic reticulum induced by brief anoxia in rat Purkinje cells. *J Comp Neurol.* 369:462-471.
- Banno T, Kohno K. (1998). Conformational Changes of the Smooth Endoplasmic Reticulum are Facilitated by L-Glutamate and its Receptors in Rat Purkinje Cells. *J Comp Neurol.* 402:252-263.
- Barbado MV, Briñón JG, Weruaga E, Porteros A, Arévalo R, Aijón J, Alonso JR. (2001). Volumetric changes in the anterior olfactory nucleus of the rat after neonatal olfactory deprivation. *Exp Neurol.* 171:379-390.
- Barbado MV, Briñón JG, Weruaga E, Porteros A, Arévalo R, Aijón J, Alonso JR. (2002). Changes in immunoreactivity to calcium-binding proteins in the anterior olfactory nucleus of the rat after neonatal olfactory deprivation. *Exp Neurol.* 177:133-150.
- Bastianelli E, Okazaki K, Hidaka H, Pochet R. (1993). Neurocalcin immunoreactivity in rat olfactory bulb. *Neurosci Lett.* 161:165-168.
- Baude A, Nusser Z, Roberts JD, Mulvihill E, McIlhinney RA, Somogyi P. (1993). The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron.* 11:771-787.
- Baude EJ, Arora VK, Yu S, Garbers DL, Wedel BJ. (1997). The cloning of a *Caenorhabditis elegans* guanylyl cyclase and the construction of a ligand-sensitive mammalian/nematode chimeric receptor. *J Biol Chem.* 272:16035-16039.
- Bear MF, Malenka RC. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol.* 4:389-399.
- Bellone C, Lüscher C, Mameli M. (2008). Mechanisms of synaptic depression triggered by metabotropic glutamate receptors. *Cell Mol Life Sci.* 65:2913-2923.
- Benson TE, Ryugo DK, Hinds JW. (1984). Effects of sensory deprivation on the developing mouse olfactory system: a light and electron microscopic, morphometric analysis. *J Neurosci.* 4:638-653.
- Bergles DE, Diamond JS, Jahr CE. (1999). Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr Opin Neurobiol.* 9:293-298.
- Berkowicz DA, Trombley PQ, Shepherd GM. (1994). Evidence for glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter. *J Neurophysiol.* 71:2557-2561.
- Berkowicz DA, Trombley PQ. (2000). Dopaminergic modulation at the olfactory nerve synapse. *Brain Res.* 855:90-99.

- Best AR, Wilson DA. (2003). A postnatal sensitive period for plasticity of cortical afferents but not cortical association fibers in rat piriform cortex. *Brain Res.* 961:81-87.
- Bhandawat V, Reisert J, Yau KW. (2005). Elementary response of olfactory receptor neurons to odorants. *Science.* 308:1931-1934.
- Bhave G, Karim F, Carlton SM, Gereau RW. (2001). Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. *Nat Neurosci.* 4:417-423.
- Bockaert J, Pin JP. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18:1723-1729.
- Bockaert J, Pin J, Fagni L. (1993). Metabotropic glutamate receptors: an original family of G protein-coupled receptors. *Fundam Clin Pharmacol.* 7:473-485.
- Boeckers TM, Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED. (2002). ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J Neurochem.* 81:903-910.
- Bollags DM, Rozycki DM, Edelstein SJ. (1996) "Protein Methods", 2nd Edition by Daniel M. Bollag, Michael D. Rozycki and Stuart J. Edelstein (1996) Published by Wiley Publishers
- Bordi F, Ugolini A. (1999). Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. *Prog Neurobiol.* 59:55-79. Review.
- Bortolotto ZA, Fitzjohn SM, Collingridge GL. (1999a). Roles of metabotropic glutamate receptors in LTP and LTD in the hippocampus. *Curr Opin Neurobiol.* 9:299-304. Review.
- Bortolotto ZA, Clarke VR, Delany CM, Parry MC, Smolders I, Vignes M, Ho KH, Miu P, Brinton BT, Fantaske R, Ogden A, Gates M, Ornstein PL, Lodge D, Bleakman D, Collingridge GL. (1999b). Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature.* 402:297-301.
- Bouvier M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2:274-286.
- Bovolin P, Bovetti S, Fasolo A, Katarova Z, Szabo G, Shipley MT, Margolis FL, Puche AC. (2009). Developmental regulation of metabotropic glutamate receptor 1 splice variants in olfactory bulb mitral cells. *J Neurosci Res.* 87:369-379.
- Bozza T, Feinstein P, Zheng C, Mombaerts P. (2002). Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *J Neurosci.* 22:3033-3043.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Huganir RL, Worley PF. (1997). Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature.* 386:284-288.
- Bredt DS, Nicoll RA. (2003). AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron.* 40, 361-379.
- Brennan PA, Keverne EB. (1997). Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Prog Neurobiol.* 51:457-481.

- Briñón JG, Alonso JR, Arévalo R, García-Ojeda E, Lara J, Aijón J. (1992). Calbindin D-28k-positive neurons in the rat olfactory bulb. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 269:289-297.
- Briñón JG, Martínez-Guijarro FJ, Bravo IG, Arévalo R, Crespo C, Okazaki K, Hidaka H, Aijón J, Alonso JR. (1999). Coexpression of neurocalcin with other calcium-binding proteins in the rat main olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 407:404-414.
- Briñón JG, Weruaga E, Crespo C, Porteros A, Arévalo R, Aijón J, Alonso JR. (2001). Calretinin-, neurocalcin-, and parvalbumin-immunoreactive elements in the olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J Comp Neurol.* 429:554-570.
- Briñón JG, Crespo C, Weruaga E, Martínez-Guijarro FJ, Aijón J, Alonso JR. (2001). Bilateral olfactory deprivation reveals a selective noradrenergic regulatory input to the olfactory bulb. *Neuroscience.* 102:1-10.
- Broadwell RD, Cataldo AM. (1984). The neuronal endoplasmic reticulum: its cytochemistry and contribution to the endomembrane system. II. Axons and terminals. *J Comp Neurol.* 230:231-248.
- Brown DA, Rose JK. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68:533-544.
- Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC. (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature.* 366:575-580.
- Brunjes PC. (1985). Unilateral odor deprivation: time course of changes in laminar volume. *Brain Res Bull.* 14:233-237.
- Brunjes PC, Smith-Crafts LK, McCarty R. (1985). Unilateral odor deprivation: effects on the development of olfactory bulb catecholamines and behavior. *Brain Res.* 354:1-6.
- Brunjes PC. (1994). Unilateral naris closure and olfactory system development. *Brain Res Brain Res Rev.* 19:146-160.
- Brusés JL, Chauvet N, Rutishauser U. (2001). Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the (alpha)7 nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J Neurosci.* 21:504-512.
- Buck LB, Axel R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell.* 65:175-187.
- Buck LB. (2005). Unraveling smell. *Harvey Lect.* 101:117-134
- Cajal SR. (1890). The origins and terminations of the olfactory, optic, and acoustic nerves in vertebrates. In studies on the cerebral cortex [Limbic structures]. Translated by Kraft LM (1955). Chicago, IL: The Year Book Publishers; pp. 1-27.
- Cajal SR. (1911a) Olfactory apparatus: Olfactory mucosa and olfactory bulb or first-order olfactory center. Histology of the nervous system, Vol. II. Translated by Swanson N, Swanson L (1995). New York: Oxford Univ. Press; pp. 532-554.
- Cajal SR. (1911b). Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres. Maloine: Paris.

- Carboni L, Piubelli C, Righetti PG, Jansson B, Domenici E. (2002). Proteomic analysis of rat brain tissue: comparison of protocols for two-dimensional gel electrophoresis analysis based on different solubilizing agents. *Electrophoresis*. 23:4132-4141.
- Carlson GC, Shipley MT, Keller A. (2000). Long-lasting depolarizations in mitral cells of the rat olfactory bulb. *J Neurosci*. 20:2011-2021.
- Carroll RC, Beattie EC, von Zastrow M, Malenka RC. (2001). Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2:315-324.
- Cartmell J, Schoepp DD. (2000). Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem*. 75:889-907.
- Casabona G, Catania MV, Storto M, Ferraris N, Perroteau I, Fasolo A, Nicoletti F, Bovolín P. (1998). Deafferentation up-regulates the expression of the mGlu1a metabotropic glutamate receptor protein in the olfactory bulb. *Eur J Neurosci*. 10:771-776.
- Chan WY, Soloviev MM, Ciruela F, McIlhinney RA. (2001). Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor 1B trafficking. *Mol Cell Neurosci*. 17:577-588.
- Chao TI, Kasa P, Wolff JR. (1997). Distribution of astroglia in glomeruli of the rat main olfactory bulb: exclusion from the sensory subcompartment of neuropil. *J Comp Neurol*. 388:191-210.
- Chen WR, Shepherd GM. (1997). Membrane and synaptic properties of mitral cells in slices of rat olfactory bulb. *Brain Res*. 745:189-196.
- Chen WR, Xiong W, Shepherd GM. (2000). Analysis of relations between NMDA receptors and GABA release at olfactory bulb reciprocal synapses. *Neuron*. 25:625-633.
- Chen WR, Shepherd GM. (2005). The olfactory glomerulus: a cortical module with specific functions. *J Neurocytol*. 34:353-360.
- Cho JY, Min N, Franzen L, Baker H. (1996). Rapid down-regulation of tyrosine hydroxylase expression in the olfactory bulb of naris-occluded adult rats. *J Comp Neurol*. 369:264-276.
- Choi KY, Chung S, Roche KW. (2011). Differential binding of calmodulin to group I metabotropic glutamate receptors regulates receptor trafficking and signaling. *J Neurosci*. 31:5921-5930.
- Choquet D, Triller A. (2003). The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci*. 4:251-265.
- Christie JM, Schoppa NE, Westbrook GL. (2001). Tufted cell dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is dependent on NMDA receptor activity. *J Neurophysiol*. 85:169-173.
- Christie JM, Westbrook GL. (2006). Lateral excitation within the olfactory bulb. *J Neurosci*. 26:2269-22677.
- Ciruela F, Soloviev MM, McIlhinney RAJ. (1999). Co-expression of metabotropic glutamate receptor type 1a with Homer-1a/Ves1-15 increases the cell surface expression of the receptor. *Biochem J*. 341:795-803.

- Ciruela F, Soloviev MM, Chan WY, McIlhinney RA. (2000). Homer-1c/Ves1-1L modulates the cell surface targeting of metabotropic glutamate receptor type 1alpha: evidence for an anchoring function. *Mol Cell Neurosci.* 15:36-50.
- Clements JD, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL. (1992). The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science.* 258:1498-1501.
- Conn PJ, Pin JP. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37:205-237.
- Conquet F, Bashir ZI, Davies CH, Daniel H, Ferraguti F, Bordi F, Karin Franz-Bacon KF, Reggiani A, Matarese V, Condé F, Collingridge GL, Crépel F. (1994). Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature.* 372:237-243.
- Cooney JR, Hurlburt JL, Selig DK, Harris KM, Fiala JC. (2002). Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J Neurosci.* 22:2215-2224.
- Copani A, Romano C, Di Giorgi Gerevini V, Nicosia A, Casabona G, Storto M, Mutel V, Nicoletti F. (2000). Reducing conditions differentially affect the functional and structural properties of group-I and -II metabotropic glutamate receptors. *Brain Res.* 867:165-172.
- Coronas V, Srivastava LK, Liang JJ, Jourdan F, Moyse E. (1997). Identification and localization of dopamine receptor subtypes in rat olfactory mucosa and bulb: a combined in situ hybridization and ligand binding radioautographic approach. *J Chem Neuroanat.* 12:243-257.
- Costantino G, Macchiarulo A, Pellicciari R. (2001). Homology model of the closed, functionally active, form of the amino terminal domain of mGluR1. *Bioorg Med Chem.* 9:847-852.
- Couper Leo JM, Devine AH, Brunjes PC. (2000). Focal denervation alters cellular phenotypes and survival in the rat olfactory bulb: a developmental analysis. *J Comp Neurol.* 425:409-421.
- Coutinho V, Kavanagh I, Sugiyama H, Tones MA, Henley JM. (2001). Characterization of a metabotropic glutamate receptor type 5-green fluorescent protein chimera (mGluR5-GFP): pharmacology, surface expression, and differential effects of Homer-1a and Homer-1c. *Mol Cell Neurosci.* 18:296-306.
- Coutinho V, Knöpfel T. (2002). Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. *Neuroscientist.* 8:551-561.
- Crespo C, Briñón JG, Porteros A, Arévalo R, Rico B, Aijón J, Alonso JR. (1999). Distribution of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the main and accessory olfactory bulbs of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J Comp Neurol.* 403:53-67.
- Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Briñón JG, Alonso JR, Domínguez MI, Martínez-Guijarro FJ. (2000). Subcellular localization of m2 muscarinic receptors in GABAergic interneurons of the olfactory bulb. *Eur J Neurosci.* 12:3963-3974.

- Crespo C, Gracia-Llanes FJ, Blasco-Ibáñez JM, Gutiérrez-Mecinas M, Marqués-Marí AI, Martínez-Guijarro FJ. (2003). Nitric oxide synthase containing periglomerular cells are GABAergic in the rat olfactory bulb. *Neurosci Lett*. 349:151-154.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE*. 255:re16.
- Cummings DM, Belluscio L. (2008). Charting plasticity in the regenerating maps of the mammalian olfactory bulb. *Neuroscientist*. 14:251-263.
- Cummings DM, Belluscio L. (2010). Continuous neural plasticity in the olfactory intrabulbar circuitry. *J Neurosci*. 30:9172-9180.
- Dale LB, Bhattacharya M, Anborgh PH, Murdoch B, Bhatia M, Nakanishi S, Ferguson SS. (2000). G protein-coupled receptor kinase-mediated desensitization of metabotropic glutamate receptor 1A protects against cell death. *J Biol Chem*. 275:38213-38220.
- Davis BJ, Macrides F, Youngs WM, Schneider SP, Rosene DL. (1978). Efferents and centrifugal afferents of the main and accessory olfactory bulbs in the hamster. *Brain Res Bull*. 3:59-72
- Davis BJ, Macrides F. (1981). The organization of centrifugal projections from the anterior olfactory nucleus, ventral hippocampal rudiment, and piriform cortex to the main olfactory bulb in the hamster: an autoradiographic study. *J Comp Neurol*. 203:475-493.
- De Bartolomeis A, Iasevoli F. (2003). The Homer family and the signal transduction system at glutamatergic postsynaptic density: potential role in behavior and pharmacotherapy. *Psychopharmacol Bull*. 37:51-83.
- De Blasi A, Conn PJ, Pin J, Nicoletti F. (2001). Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. *Trends Pharmacol Sci*. 22:114-120.
- De Olmos J, Hardy H, Heimer L. (1978). The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *J Comp Neurol*. 181:213-44.
- De Saint Jan D, Westbrook GL. (2007). Disynaptic amplification of metabotropic glutamate receptor 1 responses in the olfactory bulb. *J Neurosci*. 27:132-140.
- De Saint Jan D, Hirnet D, Westbrook GL, Charpak S. (2009). External tufted cells drive the output of olfactory bulb glomeruli. *J Neurosci*. 29:2043-2052.
- Defagot MC, Villar MJ, Antonelli MC. (2002). Differential localization of metabotropic glutamate receptors during postnatal development. *Dev Neurosci*. 24:272-282.
- Deller T, Korte M, Chabanis S, Drakew A, Schwegler H, Stefani GG, Zuniga A, Schwarz K, Bonhoeffer T, Zeller R, Frotscher M, Mundel P. (2003). Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:10494-10499.
- Dmitriev AD, Factor MI, Segal OL, Pavlova EV, Massino YS, Smirnova MB, Yakovleva DA, Dmitriev DA, Kizim EA, Kolyaskina GI, Brusov OS. (2005). Western blot analysis of human and rat serotonin transporter in platelets and brain using site-specific

- antibodies: evidence that transporter undergoes endoproteolytic cleavage. *Clin Chim Acta*. 356:76-94.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:14895-14900.
- Dong H, O'Brien RJ, Fung ET, Lanahan AA, Worley PF, Huganir RL. (1997). GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature*. 386:279-284.
- Dubnau J, Chiang AS, Tully T. (2003). Neural substrates of memory: from synapse to system. *J Neurobiol*. 54:238-253.
- Dunah AW, Yasuda RP, Wang YH, Luo J, Dávila-García M, Gbadegesin M, Vicini S, Wolfe BB. (1996). Regional and ontogenic expression of the NMDA receptor subunit NR2D protein in rat brain using a subunit-specific antibody. *J Neurochem*. 67:2335-2345.
- Duvoisin RM, Zhang C, Ramonell K. (1995). A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J Neurosci*. 15:3075-3083.
- Ehlers MD. (1999). Synapse structure: glutamate receptors connected by the shanks. *Curr Biol*. 9:848-850.
- Ehrengruber MU, Kato A, Inokuchi K, Hennou S. (2004). Homer/Vesl proteins and their roles in CNS neurons. *Mol Neurobiol*. 29:213-227.
- Elvsåshagen T, Malt UF. (2008). Structural plasticity in the adult central nervous system. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 128:298-302.
- Ennis M, Zimmer LA, Shipley MT. (1996). Olfactory nerve stimulation activates rat mitral cells via NMDA and non-NMDA receptors in vitro. *Neuroreport*. 7:989-992.
- Ennis M, Zhou FM, Ciombor KJ, Aroniadou-Anderjaska V, Hayar A, Borrelli E, Zimmer LA, Margolis F, Shipley MT. (2001). Dopamine D2 receptor-mediated presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals *J Neurophysiol*. 86:2986-2997.
- Ennis M, Hamilton KA, Hayar A (2007) Neurochemistry of the main olfactory system, In: Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, 3rd Edition (Lajtha A, Editor-in-Chief) Ed Dianna A Johnson. Springer. Heidelberg: Springer.
- Enoki R, Hu YL, Hamilton D, Fine A. (2009). Expression of long-term plasticity at individual synapses in hippocampus is graded, bidirectional, and mainly presynaptic: optical quantal analysis. *Neuron*. 62:242-253.
- Eyre MD, Antal M, Nusser Z. (2008). Distinct deep short-axon cell subtypes of the main olfactory bulb provide novel intrabulbar and extrabulbar GABAergic connections. *J Neurosci*. 28:8217-8129.
- Eyre MD, Kerti K, Nusser Z. (2009). Molecular diversity of deep short-axon cells of the rat main olfactory bulb. *Eur J Neurosci*. 29:1397-1407.
- Ezeh PI, Wellis DP, Scott JW. (1993). Organization of inhibition in the rat olfactory bulb external plexiform layer. *J Neurophysiol*. 70:263-274.

- Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J. (2000). Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci.* 23:80-88.
- Fagni L, Worley PF, Ango F. (2002). Homer as both a scaffold and transduction molecule. *Sci STKE.* 137:re8.
- Fagni L, Ango F, Perroy J, Bockaert J. (2004). Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptor-interacting proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 15:289-298.
- Feng W, Tu J, Yang T, Vernon PS, Allen PD, Worley PF, Pessah IN. (2002). Homer regulates gain of ryanodine receptor type 1 channel complex. *J. Biol. Chem.* 277, 44,722-44,730.
- Ferraguti F, Crepaldi L, Nicoletti F. (2008). Metabotropic glutamate 1 receptor: current concepts and perspectives. *Pharmacol Rev.* 60:536-581.
- Ferraris N, Perroteau I, De Marchis S, Fasolo A, Bovolín P. (1997). Glutamatergic deafferentation of olfactory bulb modulates the expression of mGluR1a mRNA. *Neuroreport.* 8:1949-1953.
- Fifková E, Markham JA, Delay RJ. (1983). Calcium in the spine apparatus of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Brain Res.* 266:163-168.
- Firestein S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature.* 413:211-218.
- Fitzjohn SM, Irving AJ, Palmer MJ, Harvey J, Lodge D, Collingridge GL. (1996). Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett.* 203:211-213.
- Flor PJ, Van Der Putten H, Rüegg D, Lukic S, Leonhardt T, Bence M, Sansig G, Knöpfel T, Kuhn R. (1997). A novel splice variant of a metabotropic glutamate receptor, human mGluR7b. *Neuropharmacology.* 36:153-159.
- Fremeau RT Jr, Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH. (2002). The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:14488-14493.
- Foa L, Rajan I, Haas K, Wu GY, Brakeman P, Worley P, Cline H. (2001). The scaffold protein, Homer1b/c, regulates axon pathfinding in the central nervous system in vivo. *Nat Neurosci.* 4:499-506.
- Fotuhi M, Sharp AH, Glatt CE, Hwang PM, von Krosigk M, Snyder SH, Dawson TM. (1993). Differential localization of phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptor (mGluR1) and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in rat brain. *J Neurosci.* 13:2001-2012.
- Francesconi A, Duvoisin RM. (2000). Opposing effects of protein kinase C and protein kinase A on metabotropic glutamate receptor signaling: selective desensitization of the inositol trisphosphate/Ca<sup>2+</sup> pathway by phosphorylation of the receptor-G protein-coupling domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6185-6190.
- Fрати C, Marchese C, Fisichella G, Copani A, Nasca MR, Storto M, Nicoletti F. (2000). Expression of functional mGlu5 metabotropic glutamate receptors in human melanocytes. *J Cell Physiol.* 183:364-372.



- Frazier LL, Brunjes PC. (1988). Unilateral odor deprivation: early postnatal changes in olfactory bulb cell density and number. *J Comp Neurol.* 269:355-370.
- Fredriksson R, Höglund PJ, Gloriam DE, Lagerström MC, Schiöth HB. (2003). Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett.* 554:381-388.
- Fu M, Zuo Y. (2011). Experience-dependent structural plasticity in the cortex. *Trends Neurosci.* 34:177-187.
- Gall C, Seroogy KB, Brecha N. (1986). Distribution of VIP- and NPY-like immunoreactivities in rat main olfactory bulb. *Brain Res.* 374:389-394.
- Gall CM, Hendry SH, Seroogy KB, Jones EG, Haycock JW. (1987). Evidence for coexistence of GABA and dopamine in neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 266:307-318.
- Gallagher SR. (2007). One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 37:6.1.1-6.1.38.
- Geiling H, Schild D. (1996). Glutamate-mediated release of Ca<sup>2+</sup> in mitral cells of the olfactory bulb. *J Neurophysiol.* 76:563-570.
- Gerber U, Gee CE, Benquet P. (2007). Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol.* 7:56-61.
- Gill SS, Pulido OM, Mueller RW, McGuire PF. (1999). Immunohistochemical localization of the metabotropic glutamate receptors in the rat heart. *Brain Res Bull.* 48:143-146.
- Giustetto M, Bovolín P, Fasolo A, Bonino M, Cantino D, Sassoe-Pognetto M. (1997). Glutamate receptors in the olfactory bulb synaptic circuitry: heterogeneity and synaptic localization of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 and AMPA receptor subunit 1. *Neuroscience.* 76:787-798.
- Goldman SA, Luskin MB. (1998). Strategies utilized by migrating neurons of the postnatal vertebrate forebrain. *Trends Neurosci.* 21:107-114.
- Gómez C, Briñón JG, Colado MI, Orio L, Vidal M, Barbado MV, Alonso JR. (2006). Differential effects of unilateral olfactory deprivation on noradrenergic and cholinergic systems in the main olfactory bulb of the rat. *Neuroscience.* 141:2117-2128.
- Gómez C, Briñón JG, Orio L, Colado MI, Lawrence AJ, Zhou FC, Vidal M, Barbado MV, Alonso JR. (2007a). Changes in the serotonergic system in the main olfactory bulb of rats unilaterally deprived from birth to adulthood. *J Neurochem.* 100:924-938.
- Gómez C, Briñón JG, Valero J, Recio JS, Murias AR, Curto GG, Orio L, Colado MI, Alonso JR. (2007b). Sex differences in catechol contents in the olfactory bulb of control and unilaterally deprived rats. *Eur J Neurosci.* 25:1517-1528.
- Gómez-Pinilla F, Guthrie KM, Leon M, Nieto-Sampedro M. (1989). NGF receptor increase in the olfactory bulb of the rat after early odor deprivation. *Brain Res Dev Brain Res.* 48:161-5.
- Gracia-Llanes FJ, Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Marqués-Marí AI, Martínez-Guijarro FJ. (2003). VIP-containing deep short-axon cells of the olfactory bulb innervate interneurons different from granule cells. *Eur J Neurosci.* 18:1751-1763.

- Gracia-Llanes FJ, Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Nacher J, Varea E, Rovira-Esteban L, Martínez-Guijarro FJ. (2010). GABAergic basal forebrain afferents innervate selectively GABAergic targets in the main olfactory bulb. *Neuroscience*. 170:913-922.
- Grant SG. (2003). Synapse signalling complexes and networks: machines underlying cognition. *Bioessays*. 25:1229-1235.
- Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. (2002). A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci*. 22:5442-5451.
- Graziadei PP, Graziadei GA. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol*. 8:1-18.
- Greer CA. (1987). Golgi analyses of dendritic organization among denervated olfactory bulb granule cells. *J Comp Neurol*. 257:442-452.
- Griff ER, Mafhouz M, Perrut A, Chaput MA. (2008a). Comparison of identified mitral and tufted cells in freely breathing rats: I. Conduction velocity and spontaneous activity. *Chem Senses*. 33:779-792.
- Griff ER, Mafhouz M, Chaput MA. (2008b). Comparison of identified mitral and tufted cells in freely breathing rats: II. Odor-evoked responses. *Chem Senses*. 33:793-802.
- Grunditz A, Holbro N, Tian L, Zuo Y, Oertner TG. (2008) Spine neck plasticity controls postsynaptic calcium signals through electrical compartmentalization. *J Neurosci*. 28:13457-13466.
- Gu Y, Publicover SJ. (2000). Expression of functional metabotropic glutamate receptors in primary cultured rat osteoblasts. Cross-talk with N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem*. 275:34252-34259.
- Guérineau NC, Gähwiler BH, Gerber U. (1994). Reduction of resting K<sup>+</sup> current by metabotropic glutamate and muscarinic receptors in rat CA3 cells: mediation by G-proteins. *J Physiol*. 474:27-33.
- Guthrie KM, Wilson DA, Leon M. (1990). Early unilateral deprivation modifies olfactory bulb function. *J Neurosci*. 10:3402-3412.
- Guthrie KM, Pullara JM, Marshall JF, Leon M. (1991). Olfactory deprivation increases dopamine D2 receptor density in the rat olfactory bulb. *Synapse*. 8:61-70.
- Gutiérrez-Mecinas M, Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Gracia-Llanes FJ, Marqués-Marí AI, Martínez-Guijarro FJ. (2005). Characterization of somatostatin- and cholecystokinin-immunoreactive periglomerular cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 489:467-479.
- Halász N, Shepherd GM. (1983). Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. *Neuroscience*. 10:579-619.
- Halász N, Nowycky MC, Shepherd GM. (1983). Autoradiographic analysis of [3H]dopamine and [3H]dopa uptake in the turtle olfactory bulb. *Neuroscience*. 8:705-715.

- Halász N, Hökfelt T, Norman AW, Goldstein M. (1985). Tyrosine hydroxylase and 28K-vitamin D-dependent calcium binding protein are localized in different subpopulations of periglomerular cells of the rat olfactory bulb. *Neurosci Lett*. 61:103-107.
- Hálasz N, Greer CA. (1993). Terminal arborizations of olfactory nerve fibers in the glomeruli of the olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 337:307-316.
- Hamilton KA, Coppola DM. (2003). Distribution of GluR1 is altered in the olfactory bulb following neonatal naris occlusion. *J Neurobiol*. 54:326-336.
- Hamilton KA, Parrish-Aungst S, Margolis FL, Erdélyi F, Szabó G, Puche AC. (2008). Sensory deafferentation transsynaptically alters neuronal GluR1 expression in the external plexiform layer of the adult mouse main olfactory bulb. *Chem Senses*. 33:201-210.
- Hamm HE, Gilchrist A. (1996). Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 8:189-196.
- Harrison TA, Scott JW. (1986). Olfactory bulb responses to odor stimulation: analysis of response pattern and intensity relationships. *J Neurophysiol*. 56:1571-1589.
- Hayar A, Karnup S, Shipley MT, Ennis M. (2004a). Olfactory bulb glomeruli: external tufted cells intrinsically burst at theta frequency and are entrained by patterned olfactory input. *J Neurosci*. 24:1190-1199.
- Hayar A, Karnup S, Ennis M, Shipley MT. (2004b). External tufted cells: a major excitatory element that coordinates glomerular activity. *J Neurosci*. 24:6676-6685.
- Hayashi T. (1952). A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn J Physiol*. 3:46-64.
- Hayashi Y, Momiyama A, Takahashi T, Ohishi H, Ogawa-Meguro R, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. (1993). Role of a metabotropic glutamate receptor in synaptic modulation in the accessory olfactory bulb. *Nature*. 366:687-690.
- Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, Bouvier M. (1996). A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem*. 271:16384-16392.
- Heinbockel T, Hamilton KA, Ennis M. (2007a). Group I metabotropic glutamate receptors are differentially expressed by two populations of olfactory bulb granule cells. *J Neurophysiol*. 97:3136-3141.
- Heidinger V, Manzerra P, Wang XQ, Strasser U, Yu SP, Choi DW, Behrens MM. (2002). Metabotropic glutamate receptor 1-induced upregulation of NMDA receptor current: mediation through the Pyk2/Src-family kinase pathway in cortical neurons. *J Neurosci*. 22:5452-5461.
- Henegar JR, Maruniak JA. (1991). Quantification of the effects of long-term unilateral naris closure on the olfactory bulbs of adult mice. *Brain Res*. 568:230-234.
- Heinbockel T, Laaris N, Ennis M. (2007b). Metabotropic glutamate receptors in the main olfactory bulb drive granule cell-mediated inhibition. *J Neurophysiol*. 97:858-870.
- Hermans E, Young KW, Challiss RA, Nahorski SR. (1998a). Effects of human type 1alpha metabotropic glutamate receptor expression level on phosphoinositide and Ca<sup>2+</sup> signalling in an inducible cell expression system. *J Neurochem*. 70:1772-1775.

- Hermans E, Nahorski SR, Challiss RA. (1998b). Reversible and non-competitive antagonist profile of CPCCOEt at the human type 1alpha metabotropic glutamate receptor. *Neuropharmacology*. 37:1645-1647.
- Hermans E, Challiss RA. (2001). Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochem J*. 359:465-484.
- Hermans E. (2003). Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*. 99:25-44. Review.
- Hioki H, Fujiyama F, Nakamura K, Wu SX, Matsuda W, Kaneko T. (2004). Chemically specific circuit composed of vesicular glutamate transporter 3- and preprotachykinin B-producing interneurons in the rat neocortex. *Cereb Cortex*. 14:1266-1275.
- Hirata Y. (1964). Some observations on the fine structure of the synapses in the olfactory bulb of the mouse, with particular reference to the atypical synaptic configurations. *Arch Histol Jpn*. 24:293-302.
- Holbro N, Grunditz A, Oertner TG. (2009). Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:15055-15060.
- Hollmann M, Heinemann S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*. 17:31-108.
- Hooker BS, Bigelow DJ, Lin CT. (2007). Methods for mapping of interaction networks involving membrane proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 363: 457-461.
- Hooper NM, Turner AJ: Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. (1988). Differential solubilization by detergents can predict a glycosylphosphatidylinositol membrane anchor. *Biochem J*. 250:865-869.
- Houamed KM, Kuijper JL, Gilbert TL, Haldeman BA, O'Hara PJ, Mulvihill ER, Almers W, Hagen FS. (1991). Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science*. 252:1318-1321.
- Hsia AY, Vincent JD, Lledo PM. (1999). Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb. *J Neurophysiol*. 82:1082-1085.
- Huang YH, Sinha SR, Tanaka K, Rothstein JD, Bergles DE. (2004). Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *J Neurosci*. 24:4551-4559.
- Hunt CA, Schenker LJ, Kennedy MB. (1996). PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses. *J Neurosci*. 16:1380-1388.
- Hunter C, Wheaton KD, Wenthold RJ. (1990). Solubilization and partial purification of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid binding sites from rat brain. *J Neurochem*. 54:118-125.
- Ikura M (1996), Calcium-binding and conformational response in EF-hand. *Proteins. Trends Biochem. Sci*. 21: 14-17.

- Isaacson JS, Strowbridge BW. (1998). Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. *Neuron*. 20:749-761.
- Isaacson JS. (1999). Glutamate spillover mediates excitatory transmission in the rat olfactory bulb. *Neuron*. 23:377-384.
- Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M. (1993). Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem*. 268:2836-2843.
- Ishikawa K, Nash SR, Nishimune A, Neki A, Kaneko S, Nakanishi S. (1999). Competitive interaction of seven in absentia homolog-1A and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin with the cytoplasmic tail of group 1 metabotropic glutamate receptors. *Genes Cells*. 4:381-390.
- Iversen L, Mulvihill E, Haldeman B, Diemer NH, Kaiser F, Sheardown M, Kristensen P. (1994). Changes in metabotropic glutamate receptor mRNA levels following global ischemia: increase of a putative presynaptic subtype (mGluR4) in highly vulnerable rat brain areas. *J Neurochem*. 63:625-633.
- Jaarsma D, Diño MR, Ohishi H, Shigemoto R, Mugnaini E. (1998). Metabotropic glutamate receptors are associated with non-synaptic appendages of unipolar brush cells in rat cerebellar cortex and cochlear nuclear complex. *J Neurocytol*. 27:303-327.
- Jackowski A, Parnavelas JG, Lieberman AR. (1978). The reciprocal synapse in the external plexiform layer of the mammalian olfactory bulb. *Brain Res*. 159:17-28.
- Jahr CE, Nicoll RA. (1982). An intracellular analysis of dendrodendritic inhibition in the turtle in vitro olfactory bulb. *J Physiol*. 326:213-234.
- Jian K, Cifelli P, Pignatelli A, Frigato E, Belluzzi O. (2010). Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate bulbar dopaminergic cell function. *Brain Res*. 1354:47-63.
- Jingami H, Nakanishi S, Morikawa K. (2003). Structure of the metabotropic glutamate receptor. *Curr Opin Neurobiol*. 13:271-278.
- Johnson BA, Woo CC, Duong H, Nguyen V, Leon M. (1995). A learned odor evokes an enhanced Fos-like glomerular response in the olfactory bulb of young rats. *Brain Res*. 699:192-200.
- Johnson BA, Woo CC, Ninomiya-Tsuboi K, Leon M. (1996). Synaptophysin-like immunoreactivity in the rat olfactory bulb during postnatal development and after restricted early olfactory experience. *Brain Res Dev Brain Res*. 92:24-30.
- Jones AR, Gibson F. (2007). An update on data standards for gel electrophoresis. *Proteomics*. 1:35-40.
- Jourdan F, Duveau A, Astic L, Holley A. (1980). Spatial distribution of [<sup>14</sup>C]2-deoxyglucose uptake in the olfactory bulbs of rats stimulated with two different odours. *Brain Res*. 188:139-154.
- Kammermeier PJ, Xiao B, Tu JC, Worley PF, Ikeda SR. (2000). Homer proteins regulate coupling of group I metabotropic glutamate receptors to N-type calcium and M-type potassium channels. *J Neurosci*. 20:7238-7245.

- Karnovsky MJ, Kleinfeld AM, Hoover RL, Klausner RD (1982). The concept of lipid domains in membranes. *J. Cell Biol.* 94: 1-6.
- Karnup SV, Hayar A, Shipley MT, Kurnikova MG. (2006). Spontaneous field potentials in the glomeruli of the olfactory bulb: the leading role of juxtglomerular cells. *Neuroscience.* 142:203-221.
- Kasa P, Hlavati I, Dobo E, Wolff A, Joo F, Wolff JR. (1995). Synaptic and non-synaptic cholinergic innervation of the various types of neurons in the main olfactory bulb of adult rat: immunocytochemistry of choline acetyltransferase. *Neuroscience.* 67:667-677.
- Kashino Y. (2003). Separation methods in the analysis of protein membrane complexes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 797: 191-216.
- Kasowski HJ, Kim H, Greer CA. (1999). Compartmental organization of the olfactory bulb glomerulus. *J Comp Neurol.* 407:261-274.
- Kato A., Ozawa F., Saitoh Y., Fukazawa Y., Sugiyama H., Inokuchi K. (1998). Novel members of the Ves1/Homer family of PDZ proteins that bind metabotropic glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 23,969-23,975.
- Katz LC, Shatz CJ. (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science.* 274:1133-1138.
- Keller A, Yagodin S, Aroniadou-Anderjaska V, Zimmer LA, Ennis M, Sheppard NF Jr, Shipley MT. (1998). Functional organization of rat olfactory bulb glomeruli revealed by optical imaging. *J Neurosci.* 18:2602-2612.
- Kennedy MB. (2000). Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science.* 290:750-754.
- Khan RM, Sobel N. (2004). Neural processing at the speed of smell. *Neuron.* 44:744-747.
- Kim E, Cho KO, Rothschild A, Sheng M. (1996). Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron.* 17:103-113.
- Kim HH, Puche AC, Margolis FL. (2006). Odorant deprivation reversibly modulates transsynaptic changes in the NR2B-mediated CREB pathway in mouse piriform cortex. *J Neurosci.* 26:9548-9559.
- Kinzie JM, Saugstad JA, Westbrook GL, Segerson TP. (1995). Distribution of metabotropic glutamate receptor 7 messenger RNA in the developing and adult rat brain. *Neuroscience.* 69:167-176.
- Kinzie JM, Shinohara MM, van den Pol AN, Westbrook GL, Segerson TP. (1997). Immunolocalization of metabotropic glutamate receptor 7 in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 385:372-384.
- Kiyokage E, Pan YZ, Shao Z, Kobayashi K, Szabo G, Yanagawa Y, Obata K, Okano H, Toida K, Puche AC, Shipley MT. (2010). Molecular identity of periglomerular and short axon cells. *J Neurosci.* 30:1185-1196.

- Kniazeff J, Bessis AS, Maurel D, Ansanay H, Prézeau L, Pin JP. (2004). Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity. *Nat Struct Mol Biol.* 11:706-713.
- Kosaka T, Hataguchi Y, Hama K, Nagatsu I, WU JY. (1985). Coexistence of immunoreactivities for glutamate decarboxylase and tyrosine hydroxylase in some neurons in the periglomerular region of the rat main olfactory bulb: possible coexistence of gamma-aminobutyric acid (GABA) and dopamine. *Brain Res.* 343:166-171.
- Kosaka K, Hama K, Nagatsu I, Wu JY, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Kosaka T. (1987a). Postnatal development of neurons containing both catecholaminergic and GABAergic traits in the rat main olfactory bulb. *Brain Res.* 403:355-360.
- Kosaka T, Kosaka K, Heizmann CW, Nagatsu I, Wu JY, Yanaihara N, Hama K. (1987b). An aspect of the organization of the GABAergic system in the rat main olfactory bulb: laminar distribution of immunohistochemically defined subpopulations of GABAergic neurons. *Brain Res.* 411:373-378.
- Kosaka T, Kosaka K, Hama K, Wu JY, Nagatsu I. (1987c). Differential effect of functional olfactory deprivation on the GABAergic and catecholaminergic traits in the rat main olfactory bulb. *Brain Res.* 413:197-203.
- Kosaka K, Hama K, Nagatsu I, Wu JY, Kosaka T. (1988). Possible coexistence of amino acid (gamma-aminobutyric acid), amine (dopamine) and peptide (substance P); neurons containing immunoreactivities for glutamic acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase and substance P in the hamster main olfactory bulb. *Exp Brain Res.* 71:633-642.
- Kosaka K, Toida K, Margolis FL, Kosaka T. (1997). Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb--II. Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals. *Neuroscience.* 76:775-786.
- Kosaka K, Toida K, Aika Y, Kosaka T. (1998). How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res.* 30:101-110.
- Kosaka K, Kosaka T. (2005a). Synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anat Sci Int.* 80:80-90.
- Kosaka T, Kosaka K. (2005b). Structural organization of the glomerulus in the main olfactory bulb. *Chem Senses.* 30:107-108.
- Kosaka K, Kosaka T. (2007a). Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb. *Brain Res.* 1167:42-55
- Kosaka T, Kosaka K. (2007b). Heterogeneity of nitric oxide synthase-containing neurons in the mouse main olfactory bulb. *Neurosci Res.* 57:165-178.

- Kosaka T, Komada M, Kosaka K. (2008). Sodium channel cluster, betaIV-spectrin and ankyrinG positive "hot spots" on dendritic segments of parvalbumin-containing neurons and some other neurons in the mouse and rat main olfactory bulbs. *Neurosci Res.* 62:176-186.
- Kosaka T, Kosaka K. (2008). Tyrosine hydroxylase-positive GABAergic juxtglomerular neurons are the main source of the interglomerular connections in the mouse main olfactory bulb. *Neurosci Res.* 60:349-354.
- Kosaka T, Kosaka K. (2011). "Interneurons" in the olfactory bulb revisited. *Neurosci Res.* 69:93-99.
- Koster NL, Norman AB, Richtand NM, Nickell WT, Puche AC, Pixley SK, Shipley MT. (1999). Olfactory receptor neurons express D2 dopamine receptors. *J Comp Neurol.* 411:666-673.
- Kratskin I L, Belluzzi O. (2003). Anatomy and neurochemistry of the olfactory bulb. Marcel Dekker. 139-164.. Nueva York, Doty RL ed. Handbook of olfaction and gestation.
- Krause F. (2006). Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis.* 27: 2759-2781.
- Kreienkamp HJ. (2002a). Organisation of G-protein-coupled receptor signalling complexes by scaffolding proteins. *Curr Opin Pharmacol.* 2:581-586.
- Kreienkamp HJ, Soltau M, Richter D, Böckers T. (2002b). Interaction of G-protein-coupled receptors with synaptic scaffolding proteins. *Biochem Soc Trans.* 30:464-468.
- Kroeze WK, Sheffler DJ, Roth BL. (2003). G-protein-coupled receptors at a glance. *J Cell Sci.* 116:4867-4869.
- Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, Morikawa K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature.* 407:971-977.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagier S, Carleton A, Lledo PM. (2004). Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates gamma oscillations in the rat olfactory bulb. *J Neurosci.* 24:4382-4392.
- Lan JY, Skeberdis VA, Jover T, Zheng X, Bennett MV, Zukin RS. (2001). Activation of metabotropic glutamate receptor 1 accelerates NMDA receptor trafficking. *J Neurosci.* 21:6058-6068.
- Lancet D, Greer CA, Kauer JS, Shepherd GM. (1982). Mapping of odor-related neuronal activity in the olfactory bulb by high-resolution 2-deoxyglucose autoradiography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:670-674.
- Lapointe V, Morin F, Ratté S, Croce A, Conquet F, Lacaille JC. (2004). Synapse-specific mGluR1-dependent long-term potentiation in interneurons regulates mouse hippocampal inhibition. *J Physiol.* 555:125-135.



- Laurent G. (1996). Dynamical representation of odors by oscillating and evolving neural assemblies. *Trends Neurosci.* 19:489-496.
- Laurie DJ, Boddeke HW, Hiltcher R, Sommer B. (1996). HmGlu1d, a novel splice variant of the human type I metabotropic glutamate receptor. *Eur J Pharmacol.* 302:229.
- Lavreysen H, Pereira SN, Leysen JE, Langlois X, Lesage AS. (2004). Metabotropic glutamate 1 receptor distribution and occupancy in the rat brain: a quantitative autoradiographic study using [3H]R214127. *Neuropharmacology.* 46:609-619.
- Lee SP, Xie Z, Varghese G, Nguyen T, O'Dowd BF, George SR. (2000). Oligomerization of dopamine and serotonin receptors. *Neuropsychopharmacology.* 23, 32-40.
- LeMasurier M, Gillespie PG. (2005). Hair-cell mechanotransduction and cochlear amplification. *Neuron.* 48:403-415.
- Leung CH, Wilson DA. (2003). Trans-neuronal regulation of cortical apoptosis in the adult rat olfactory system. *Brain Res.* 984:182-128.
- Libri V, Constanti A, Zibetti M, Postlethwaite M. (1997). Metabotropic glutamate receptor subtypes mediating slow inward tail current (IADP) induction and inhibition of synaptic transmission in olfactory cortical neurones. *Br J Pharmacol.* 120:1083-1095.
- Lim JH, Brunjes PC. (1999). Calcium-binding proteins: differential expression in the rat olfactory cortex after neonatal olfactory bulbectomy. *J Neurobiol.* 39:207-217.
- Lim S, Naisbitt S, Yoon J, Hwang JI, Suh PG, Sheng M, Kim E. (1999). Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing, and differential expression in brain and development. *J Biol Chem.* 274: 29510-29518.
- Lin DY, Zhang SZ, Block E, Katz LC. (2005). Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature.* 434:470-477.
- Limbird LE, Meyts PD, Lefkowitz RJ. (1975). Beta-adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity. *Biochem Biophys Res Commun.* 64:1160-1168.
- Lisanti MP, Tang ZL, Sargiacomo M. (1993). Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae. *J Cell Biol.* 123:595-604.
- Lisman J. (2003). Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 29:829-842.
- Liu CJ, Grandes P, Matute C, Cuénod M, Streit P. (1989). Glutamate-like immunoreactivity revealed in rat olfactory bulb, hippocampus and cerebellum by monoclonal antibody and sensitive staining method. *Histochemistry.* 90:427-445.
- Liu WL, Shipley MT. (1994). Intrabulbar associational system in the rat olfactory bulb comprises cholecystinin-containing tufted cells that synapse onto the dendrites of GABAergic granule cells. *J Comp Neurol.* 346:541-558.
- Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoechl K, Wang Y, Sheng M, Auberson YP, Wang YT. (2004). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science.* 304:1021-1024.

- Liu S, Shipley MT. (2008). Intrinsic conductances actively shape excitatory and inhibitory postsynaptic responses in olfactory bulb external tufted cells. *J Neurosci*. 28:10311-10322.
- Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD. (2005). Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev*. 85:281-317.
- Lodovichi C, Belluscio L, Katz LC. (2003). Functional topography of connections linking mirror-symmetric maps in the mouse olfactory bulb. *Neuron*. 38:265-276.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 264:1145-1148.
- London E, Brown DA. (2000). Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta*. 1508:182-195.
- López-Mascaraque L, De Carlos JA, Valverde F. (1986). Structure of the olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*): description of cell types in the granular layer. *J Comp Neurol*. 253:135-152.
- Luo M, Katz LC. (2001). Response correlation maps of neurons in the mammalian olfactory bulb. *Neuron*. 32:1165-1179.
- Luján R, Nusser Z, Roberts JD, Shigemoto R, Somogyi P. (1996). Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 8:1488-1500.
- Luján R, Roberts JD, Shigemoto R, Ohishi H, Somogyi P. (1997). Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J Chem Neuroanat*. 13:219-241.
- Luján R, Ciruela F. (2001). Immunocytochemical localization of metabotropic glutamate receptor type 1 alpha and tubulin in rat brain. *Neuroreport*. 12:1285-1291.
- Lüscher C, Xia H, Beattie EC, Carroll RC, von Zastrow M, Malenka RC, Nicoll RA. (1999). Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron*. 24:649-658.
- Luskin MB. (1998). Neuroblasts of the postnatal mammalian forebrain: their phenotype and fate. *J Neurobiol*. 36:221-233.
- Ma J, Lowe G. (2010). Correlated firing in tufted cells of mouse olfactory bulb *Neuroscience*. 169:1715-1738.
- Macrides F, Schneider SP. (1982). Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster. *J Comp Neurol*. 208:419-340.
- MacDonald JF, Jackson MF, Beazely MA. (2006). Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors. *Crit Rev Neurobiol* 18:71-84.
- Maggio R, Vogel Z, Wess J. (1993). Reconstitution of functional muscarinic receptors by co-expression of amino- and carboxyl-terminal receptor fragments. *FEBS Lett*. 319:195-200.

- Maher BJ, Westbrook GL. (2008). Co-transmission of dopamine and GABA in periglomerular cells. *J Neurophysiol.* 99:1559-1564.
- Makoff AJ, Phillips T, Pilling C, Emson P. (1997). Expression of a novel splice variant of human mGluR1 in the cerebellum. *Neuroreport.* 8:2943-2947.
- Maletic-Savatic M, Lenn NJ, Trimmer JS. (1995). Differential spatiotemporal expression of K<sup>+</sup> channel polypeptides in rat hippocampal neurons developing in situ and in vitro. *J Neurosci.* 15:3840-3851.
- Malinow, R., Malenka, R.C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 103-126.
- Mandairon N, Didier A, Linster C. (2008). Odor enrichment increases interneurons responsiveness in spatially defined regions of the olfactory bulb correlated with perception. *Neurobiol Learn Mem.* 90:178-184.
- Mandairon N, Linster C. (2009). Odor perception and olfactory bulb plasticity in adult mammals. *J Neurophysiol.* 101:2204-2209.
- Mandiyan VS, Coats JK, Shah NM. (2005). Deficits in sexual and aggressive behaviors in *Cnga2* mutant mice. *Nat Neurosci.* 8:1660-1662.
- Mansour A, Meador-Woodruff JH, Bunzow JR, Civelli O, Akil H, Watson SJ. (1990). Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *J Neurosci.* 10:2587-2600.
- Mao LM, Liu XY, Zhang GC, Chu XP, Fibuch EE, Wang LS, Liu Z, Wang JQ. (2008). Phosphorylation of group I metabotropic glutamate receptors (mGluR1/5) in vitro and in vivo. *Neuropharmacology.* 55:403-408.
- Martin LJ, Blackstone CD, Huganir RL, Price DL. (1992). Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron.* 9:259-270.
- Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, Huganir RL, Price DL. (1993). AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience.* 53:327-358.
- Martone ME, Zhang Y, Simpliciano VM, Carragher BO, Ellisman MH. (1993). Three-dimensional visualization of the smooth endoplasmic reticulum in Purkinje cell dendrites. *J Neurosci.* 13:4636-4646.
- Marzoa J, Abel A, Sánchez S, Chan H, Feavers I, Criado MT, Ferreirós CM. (2009). Analysis of outer membrane porin complexes of *Neisseria meningitidis* in wild-type and specific knock-out mutant strains. *Proteomics.* 9:648-656.
- Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, Shigemoto R, Nakanishi S. (1991). Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature.* 349:760-765.
- Matsutani S, Yamamoto N. (2000). Differentiation of mitral cell dendrites in the developing main olfactory bulbs of normal and naris-occluded rats. *J Comp Neurol.* 418:402-410.
- Mattson MP, Meffert MK. (2006). Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ.* 13:852-860.

- Mayor S, Rao M. (2004). Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic*. 5:231-240.
- McLean JH, Shipley MT. (1987). Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: I. Origins and laminar specificity of serotonergic inputs in the adult rat. *J Neurosci*. 7:3016-3028.
- McLean JH, Shipley MT. (1988). Postmitotic, postmigrational expression of tyrosine hydroxylase in olfactory bulb dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 8:3658-3669.
- McLean JH, Shipley MT, Nickell WT, Aston-Jones G, Reyher CK. (1989). Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *J Comp Neurol*. 285:339-349.
- McLean JH, Darby-King A, Bonnell WS. (2001). Neonatal olfactory sensory deprivation decreases BDNF in the olfactory bulb of the rat. *Brain Res Dev Brain Res*. 128:17-24.
- McQuiston AR, Katz LC. (2001). Electrophysiology of interneurons in the glomerular layer of the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol*. 86:1899-1907.
- Meisami E, Mousavi R. (1981). Lasting effects of early olfactory deprivation on the growth, DNA, RNA and protein content, and Na-K-ATPase and AchE activity of the rat olfactory bulb. *Brain Res*. 254:217-229.
- Meldrum B, Garthwaite J. (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*. 9:379-387.
- Migliore M, Hines ML, McTavish TS, Shepherd GM. (2010). Functional roles of distributed synaptic clusters in the mitral-granule cell network of the olfactory bulb. *Front Integr Neurosci*. 20:4:122.
- Miller LP, Johnson AE, Gelhard RE, Insel TR. (1990). The ontogeny of excitatory amino acid receptors in the rat forebrain--II. Kainic acid receptors. *Neuroscience*. 35:45-51.
- Mills CD, Xu GY, McAdoo DJ, Hulsebosch CE. (2001a). Involvement of metabotropic glutamate receptors in excitatory amino acid and GABA release following spinal cord injury in rat. *J Neurochem*. 79:835-848.
- Mills CD, Fullwood SD, Hulsebosch CE. (2001b). Changes in metabotropic glutamate receptor expression following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 170:244-257.
- Minakami R, Katsuki F, Sugiyama H. (1993). A variant of metabotropic glutamate receptor subtype 5: an evolutionally conserved insertion with no termination codon. *Biochem Biophys Res Commun*. 194:622-627.
- Minakami R, Katsuki F, Yamamoto T, Nakamura K, Sugiyama H. (1994). Molecular cloning and the functional expression of two isoforms of human metabotropic glutamate receptor subtype 5. *Biochem Biophys Res Commun*. 199:1136-1143.
- Minami I, Kengaku M, Smitt PS, Shigemoto R, Hirano T. (2003). Long-term potentiation of mGluR1 activity by depolarization-induced Homer1a in mouse cerebellar Purkinje neurons. *Eur J Neurosci*. 17:1023-1032.
- Miyamoto E. (2006). Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci*. 100:433-442.

- Mody N, Hermans E, Nahorski SR, Challiss RA. (1999). Inhibition of N-linked glycosylation of the human type 1alpha metabotropic glutamate receptor by tunicamycin: effects on cell-surface receptor expression and function. *Neuropharmacology*. 38:1485-1492.
- Moepps B, Fagni L. (2003). Mont Sainte-Odile: a sanctuary for GPCRs. Confidence on signal transduction of G-protein-couple receptors. *EMBO Rep*. 4:237-243.
- Molinari M; Helenius A. (2002). Analyzing cotranslational protein folding and disulfide formation by diagonal sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: Sies, H., Packers, L., Eds.; *Methods in Enzimology*; Academic Press: New York, 348, 35-42.
- Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*. 87:675-686.
- Monaghan DT, Cotman CW. (1982). The distribution of [3H]kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Res*. 252:91-100.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 29:365-402.
- Montague AA, Greer CA. (1999). Differential distribution of ionotropic glutamate receptor subunits in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 405:233-246.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*. 12:529-540.
- Mori K, Kishi K, Ojima H. (1983). Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 219:339-355.
- Mori K. (1987). Membrane and synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb. *Prog Neurobiol*. 29:275-320.
- Mori K, Nagao H, Sasaki YF. (1998). Computation of molecular information in mammalian olfactory systems. *Network*. 9:79-102.
- Mori K, Nagao H, Yoshihara Y. (1999). The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science*. 286:711-715.
- Mugnaini E, Oertel WH, Wouterlood FF. (1984a). Immunocytochemical localization of GABA neurons and dopamine neurons in the rat main and accessory olfactory bulbs. *Neurosci Lett*. 47:221-226.
- Mugnaini E, Wouterlood FG, Dahl AL, Oertel WH. (1984b). Immunocytochemical identification of GABAergic neurons in the main olfactory bulb of the rat. *Arch Ital Biol*. 122:83-113.
- Murphy GJ, Glickfeld LL, Balsen Z, Isaacson JS. (2004). Sensory neuron signaling to the brain: properties of transmitter release from olfactory nerve terminals. *J Neurosci*. 24:3023-3030.
- Murphy GJ, Darcy DP, Isaacson JS. (2005). Intraglomerular inhibition: signaling mechanisms of an olfactory microcircuit. *Nat Neurosci*. 8:354-364.

- Nagayama S, Takahashi YK, Yoshihara Y, Mori K. (2004). Mitral and tufted cells differ in the decoding manner of odor maps in the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol.* 91:2532-2540.
- Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron.* 23:569-582.
- Nakajima Y, Iwakabe H, Akazawa C, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N y Nakanishi S. (1993). Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J Biol Chem.* 268:11868-11873.
- Nakamura M, Sato K, Fukaya M, Araishi K, Aiba A, Kano M, Watanabe M. (2004). Signaling complex formation of phospholipase C $\beta$ 4 with metabotropic glutamate receptor type 1 $\alpha$  and 1,4,5-trisphosphate receptor at the perisynapse and endoplasmic reticulum in the mouse brain. *Eur J Neurosci.* 20:2929-2944.
- Nakanishi S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* 258:597-603.
- Nakanishi S, Masu M. (1994). Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*;23:319-348.
- Nakanishi S. (1995). Second-order neurones and receptor mechanisms in visual- and olfactory-information processing. *Trends Neurosci.* 18:359-364.
- Nakano A, Terasawa M, Watanabe M, Usuda N, Morita T, Hidaka H. (1992). Neurocalcin, a novel calcium-binding protein with three EF-hand domains, expressed in retinal amacrine cells and ganglion cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 186:1207-1211.
- Niethammer M, Kim E, Sheng M. (1996). Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci.* 16:2157-2163.
- Neugebauer JM. (1990). Detergents: an overview. *Methods Enzymol.* 182:239-253.
- Ng AN, Toresson H. (2011). Endoplasmic reticulum dynamics in hippocampal dendritic spines induced by agonists of type I metabotropic glutamate but not by muscarinic acetylcholine receptors. *Synapse.* 65:351-355.
- Ni B, Rosteck PR Jr, Nadi NS, Paul SM. (1994). Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;91:5607-5611.
- Nickell WT, Norman AB, Wyatt LM, Shipley MT. (1991). Olfactory bulb DA receptors may be located on terminals of the olfactory nerve. *Neuroreport.* 2:9-12.
- Nicoletti F, Wroblewski JT, Fadda E, Costa E. (1988). Pertussis toxin inhibits signal transduction at a specific metabotropic glutamate receptor in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuropharmacology.* 27:551-556.
- Nicoll RA, Jahr CE. (1982). Self-excitation of olfactory bulb neurones. *Nature.* 1;296:441-444.
- Nicoll RA, Malenka RC. (1999). Leaky synapses. *Neuron.* 23:197-198.

- Ohishi H, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. (1993a). Distribution of the messenger RNA for a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat. *Neuroscience*. 53:1009-1018.
- Ohishi H, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. (1993b). Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR3) in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*. 335:252-266.
- Ohishi H, Nomura S, Ding YQ, Shigemoto R, Wada E, Kinoshita A, Li JL, Neki A, Nakanishi S, Mizuno N. (1995). Presynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR7, in the primary afferent neurons: an immunohistochemical study in the rat. *Neurosci Lett*. 202:85-88.
- Ohlendieck K. (1996). Extraction of membrane proteins. *Methods Mol Biol*;59:293-304.
- Ohmomo H, Ina A, Yoshida S, Shutoh F, Ueda S, Hisano S. (2009). Postnatal changes in expression of vesicular glutamate transporters in the main olfactory bulb of the rat. *Neuroscience*. 160:419-26.
- Okamoto N, Hori S, Akazawa C, Hayashi Y, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. (1994). Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J Biol Chem*. 269:1231-1236.
- Okamoto T, Schwab RB, Scherer PE, Lisanti MP. (2001). Analysis of the association of proteins with membranes. *Curr Protoc Cell Biol*.;Chapter 5:Unit 5.4.
- Onteniente B, Tago H, Kimura H, Maeda T. (1986). Distribution of gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the septal region of the rat brain. *J Comp Neurol*. 248:422-430.
- Orona E, Scott JW, Rainer EC. (1983). Different granule cell populations innervate superficial and deep regions of the external plexiform layer in rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 217:227-237.
- Orona E, Rainer EC, Scott JW. (1984). Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 226:346-356.
- Park M, Penick EC, Edwards JG, Kauer JA, Ehlers MD (2004). Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science*. 305:1972-1975.
- Parrish-Aungst S, Shipley MT, Erdelyi F, Szabo G, Puche AC. (2007). Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 501:825-836.
- Petralia RS, Wenthold RJ. (1992). Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J Comp Neurol*. 318:329-354.
- Petralia RS, Yokotani N, Wenthold RJ. (1994a). Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J Neurosci*. 14:667-696.
- Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ. (1994b). The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *J Neurosci*. 14:6102-6120.

- Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ. (1994c). Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J Comp Neurol.* 349:85-110.
- Petralia RS, Wanga Y-X, Niedzielskia AS, Wentholda RJ. (1996). The metabotropic glutamate receptors, MGLUR2 and MGLUR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience.* 71:949-976.
- Petralia RS, Wang YX, Singh S, Wu C, Shi L, Wei J, Wenthold RJ. (1997). A monoclonal antibody shows discrete cellular and subcellular localizations of mGluR1 alpha metabotropic glutamate receptors. *J Chem Neuroanat.* 13:77-93.
- Petralia RS, Sans N, Wang YX, Wenthold RJ. (2005). Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Mol Cell Neurosci.* 29:436-452.
- Philpot BD, Lim JH, Halpain S, Brunjes PC. (1997a). Experience-dependent modifications in MAP2 phosphorylation in rat olfactory bulb. *J Neurosci.* 17:9596-9604.
- Philpot BD, Lim JH, Brunjes PC. (1997b). Activity-dependent regulation of calcium-binding proteins in the developing rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 387:12-26.
- Philpot BD, Lyders EM, Brunjes PC. (1998). The NMDA receptor participates in respiration-related mitral cell synchrony. *Exp Brain Res.* 118:205-209.
- Pin JP, Waeber C, Prezeau L, Bockaert J, Heinemann SF. (1992). Alternative splicing generates metabotropic glutamate receptors inducing different patterns of calcium release in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:10331-10335.
- Pin JP, Bockaert J. (1995). Get receptive to metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 5:342-349.
- Pin JP, Duvoisin R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology.* 34:1-26.
- Pinching AJ. (1970). Synaptic connexions in the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Physiol.* 210:14-15.
- Pinching AJ, Powell TP. (1971a). The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci.* 9:305-345.
- Pinching AJ, Powell TP. (1971b). The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J Cell Sci.* 9:347-377.
- Pinching AJ, Powell TP. (1971c). The neuropil of the periglomerular region of the olfactory bulb. *J Cell Sci.* 9:379-409.
- Pinching AJ, Powell TP. (1972a). A study of terminal degeneration in the olfactory bulb of the rat. *J Cell Sci.* 10:585-619.
- Pinching AJ, Powell TP. (1972b). Experimental studies on the axons intrinsic to the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci.* 10:637-655.
- Plendl J, Stierstorfer B, Sinowatz F. (1999). Growth factors and their receptors in the olfactory system. *Anat Histol Embryol.* 28:73-79.



- Pressler RT, Strowbridge BW. (2006). Blanes cells mediate persistent feedforward inhibition onto granule cells in the olfactory bulb. *Neuron*. 49:889-904
- Prézeau L, Gomeza J, Ahern S, Mary S, Galvez T, Bockaert J, Pin JP. (1996). Changes in the carboxyl-terminal domain of metabotropic glutamate receptor 1 by alternative splicing generate receptors with differing agonist-independent activity. *Mol Pharmacol*. 49:422-429.
- Price JL, Powell TP. (1970a). The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci*. 7:631-651.
- Price JL, Powell TP. (1970b). The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci*. 7:91-123.
- Puche AC, Shipley MT. (1999). Odor-induced, activity-dependent transneuronal gene induction in vitro: mediation by NMDA receptors. *J Neurosci*. 19:1359-1370.
- Quinlan EM, Philpot BD, Haganir RL, Bear MF. (1999). Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. *Nat Neurosci*. 2:352-357.
- Quinn MR, Cagan RH. (1980). Subcellular distribution of glutamate decarboxylase in rat olfactory bulb: high content in dendrodendritic synaptosomes. *J Neurochem*. 35:583-590.
- Quinn MR, Cagan RH. (1982). High specific binding of [3H]GABA and [3H]muscimol to membranes from dendrodendritic synaptosomes of the rat olfactory bulb. *J Neurochem*. 39:1381-1386.
- Rall W, Shepherd GM, Reese TS, Brightman MW. (1966). Dendrodendritic synaptic pathway for inhibition in the olfactory bulb. *Exp Neurol*. 14:44-56.
- Rao VR, Finkbeiner S. (2007). NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. *Trends Neurosci*. 30:284-291.
- Ray K, Hauschild BC. (2000). Cys-140 is critical for metabotropic glutamate receptor-1 dimerization. *J Biol Chem*. 275:34245-34251.
- Reisner AH, Nemes P, Bucholtz C. (1975). The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 64:509-516.
- Remelli R, Robbins MJ, McIlhinney RA. (2008). The C-terminus of the metabotropic glutamate receptor 1b regulates dimerization of the receptor. *J Neurochem*. 104:1020-1031.
- Résibois A, Rogers JH. (1992). Calretinin in rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroscience*. 46:101-134.
- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB. (1994). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell*. 79:1245-1255.
- Reynolds ES. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*. 17:208-212.

- Ribak CE, Vaughn JE, Saito K, Barber R, Roberts E. (1977). Glutamate decarboxylase localization in neurons of the olfactory bulb. *Brain Res.* 126:1-18.
- Riedel G. (1996). Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory. *Trends Neurosci.* 19:219-224.
- Robbins MJ, Ciruela F, Rhodes A, McIlhinney RA. (1999). Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1alpha. *J Neurochem.* 72:2539-2547.
- Roche KW, Tingley WG, Huganir RL. (1994). Glutamate receptor phosphorylation and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 4:383-8.
- Roche KW, Tu JC, Petralia RS, Xiao B, Wenthold, RJ, Worley PF. (1999). Homer 1b regulates the trafficking of group I metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem.* 274:25953-25957.
- Romano C, Sesma MA, McDonald CT, O'Malley K, Van den Pol AN, Olney JW. (1995). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol.* 355:455-469.
- Romano C, Yang WL, O'Malley KL. (1996a). Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem.* 271:28612-28616.
- Romano C, van den Pol AN y O'Malley KL. (1996b). Enhanced early developmental expression of the metabotropic glutamate receptor mGluR5 in rat brain: protein, mRNA splice variants, and regional distribution. *J Comp Neurol.* 367:403-412.
- Romano C, Miller JK, Hyrc K, Dikranian S, Mennerick S, Takeuchi Y, Goldberg MP, O'Malley KL. (2001). Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization. *Mol Pharmacol.* 59:46-53.
- Rossi DJ, Alford S, Mugnaini E, Slater NT. (1995). Properties of transmission at a giant glutamatergic synapse in cerebellum: the mossy fiber-unipolar brush cell synapse. *J Neurophysiol.* 74:24-42.
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 68:673-682.
- Sahara Y, Kubota T, Ichikawa M. (2001). Cellular localization of metabotropic glutamate receptors mGluR1, 2/3, 5 and 7 in the main and accessory olfactory bulb of the rat. *Neurosci Lett.* 312:59-62.
- Sala C, Piëch V, Wilson NR, Passafaro M, Liu G, Sheng M. (2001). Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron.* 31:115-130.
- Sala C, Futai K, Yamamoto K, Worley PF, Hayashi Y, Sheng M. (2003). Inhibition of dendritic spine morphogenesis and synaptic transmission by activity-inducible protein Homer1a. *J Neurosci.* 23:6327-6337.
- Sala C, Roussignol G, Meldolesi J, Fagni L. (2005). Key role of the postsynaptic density scaffold proteins Shank and Homer in the functional architecture of Ca<sup>2+</sup> homeostasis at dendritic spines in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 25:4587-4592.

- Salin PA, Lledo PM, Vincent JD, Charpak S. (2001). Dendritic glutamate autoreceptors modulate signal processing in rat mitral cells. *J Neurophysiol.* 85:1275-1282.
- Sánchez S, Arenas J, Abel A, Criado MT, Ferreirós CM. (2005). Analysis of outer membrane protein complexes and heat-modifiable proteins in *Neisseria* strains using two-dimensional diagonal electrophoresis. *J. Proteome Res.* 4:91-95.
- Sánchez S, Abel A, Marzoa J, Gorringer A, Criado T, Ferreirós CM. (2009). Characterisation and immune responses to meningococcal recombinant porin complexes incorporated into liposomes. *Vaccine.* 27:5338-5343.
- Sassoè-Pognetto M, Cantino D, Panzanelli P, Verdun di Cantogno L, Giustetto M, Margolis FL, De Biasi S, Fasolo A. (1993). Presynaptic co-localization of carnosine and glutamate in olfactory neurones. *Neuroreport.* 5:7-10.
- Sassoè-Pognetto M, Ottersen OP. (2000). Organization of ionotropic glutamate receptors at dendrodendritic synapses in the rat olfactory bulb. *J Neurosci.* 20:2192-2201.
- Sassoé-Pognetto M, Utvik JK, Camoletto P, Watanabe M, Stephenson FA, Brecht DS, Ottersen OP. (2003). Organization of postsynaptic density proteins and glutamate receptors in axodendritic and dendrodendritic synapses of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 463:237-248.
- Sato T, Shimada Y, Nagasawa N, Nakanishi S, Jingami H. (2003). Amino acid mutagenesis of the ligand binding site and the dimer interface of the metabotropic glutamate receptor 1. Identification of crucial residues for setting the activated state. *J Biol Chem.* 278:4314-4321.
- Saugstad JA, Kinzie JM, Mulvihill ER, Segerson TP, Westbrook GL. (1994). Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-phosphonobutyric acid-sensitive class of metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol.* 45:367-372.
- Scannevin RH, Huganir RL. (2000). Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci.* 1:133-141.
- Schäfer MK, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD. (2002). Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem.* Dec 27;277(52):50734-48
- Schagger H, von Jagow G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, 199, 223-231.
- Schneider SP, Macrides F. (1978). Laminar distributions of interneurons in the main olfactory bulb of the adult hamster. *Brain Res Bull.* 3:73-82.
- Schoenfeld TA, Macrides F. (1984). Topographic organization of connections between the main olfactory bulb and pars externa of the anterior olfactory nucleus in the hamster. *J Comp Neurol.* 227:121-135.
- Schoenfeld TA, Marchand JE, Macrides F. (1985). Topographic organization of tufted cell axonal projections in the hamster main olfactory bulb: an intrabulbar associational system. *J Comp Neurol.* 235:503-518.

- Schoepp D, Bockaert J, Sladeczek F. (1990). Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 12:508-515.
- Schoppa NE, Kinzie JM, Sahara Y, Segerson TP, Westbrook GL. (1998). Dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is driven by NMDA receptors. *J Neurosci.* 18:6790-6802.
- Schoppa NE, Westbrook GL. (2001). Glomerulus-specific synchronization of mitral cells in the olfactory bulb. *Neuron.* 31:639-651.
- Schoppa NE, Westbrook GL. (2002). AMPA autoreceptors drive correlated spiking in olfactory bulb glomeruli. *Nat Neurosci.* 5:1194-1202.
- Schoppa NE, Urban NN. (2003). Dendritic processing within olfactory bulb circuits. *Trends Neurosci.* 26:501-506.
- Schroeder R, London E, Brown D. (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:12130-12134.
- Scott JW. (1986). The olfactory bulb and central pathways. *Experientia.* 42:223-232.
- Scott JW. (1987). Organization of olfactory bulb output cells and their local circuits. *Ann N Y Acad Sci.* 510:44-48.
- Selkirk JV, Challiss RA, Rhodes A, McIlhinney RA. (2002). Characterization of an N-terminal secreted domain of the type-1 human metabotropic glutamate receptor produced by a mammalian cell line. *J Neurochem.* 80:346-353.
- Serogy KB, Brecha N, Gall C. (1985). Distribution of cholecystokinin-like immunoreactivity in the rat main olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 239:373-383.
- Shao Z, Puche AC, Kiyokage E, Szabo G, Shipley MT. (2009). Two GABAergic intraglomerular circuits differentially regulate tonic and phasic presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals. *J Neurophysiol.* 101:1988-2001.
- Sheng M. (1997). Excitatory synapses. Glutamate receptors put in their place. *Nature.* 386:221, 223.
- Sheng M, Kim E. (2000). The Shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci.* 113:1851-1856.
- Shepherd GM, Greer CA (1990) Olfactory bulb. In: Shepherd, GM (ed). The synaptic organization of the brain. Oxford University Press, Oxford, pp 133-169.
- Shepherd GM, Chen WR, Greer CA. (2004). Olfactory bulb. In The Synaptic Organization of the Brain, G.M. Shepherd, ed. (New York: Oxford University Press), pp. 165-216.
- Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, Zaman SH, Wenthold RJ, Svoboda K, Malinow R (1999). Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284, 1811-1816.
- Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. (1992). Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an in situ hybridization study in adult and developing rat. *J Comp Neurol.* 322:121-135.

- Shigemoto R, Nomura S, Ohishi H, Sugihara H, Nakanishi S, Mizuno N. (1993). Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. *Neurosci Lett.* 163:53-57.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N. (1997). Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 17:7503-7522.
- Shinohara Y, Hirase H. (2009). Size and Receptor Density of Glutamatergic Synapses: A Viewpoint from Left-Right Asymmetry of CA3-CA1 Connections. *Front Neuroanat.*;3:10.
- Shinohara Y. (2011). Quantification of postsynaptic density proteins: Glutamate receptor subunits and scaffolding proteins. *Hippocampus.* (En prensa, accesible en PubMed: doi: 10.1002/hipo.20950).
- Shiraishi Y, Mizutani A, Bito H, Fujisawa K, Narumiya S, Mikoshiba K, Furuichi T. (1999). Cupidin, an isoform of Homer/Vesl, interacts with the actin cytoskeleton and activated Rho family small GTPases and is expressed in developing mouse cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 19, 8389-8400.
- Shiraishi-Yamaguchi Y, Furuichi T. (2007). The Homer family proteins. *Genome Biol.* 8:206
- Shibley, M.T., McLean, J.H. and Ennis, M. (1995) Olfactory system. In Paxinos, J. (ed.), *The Rat Nervous System*, 2nd edn. Academic Press, Sydney, pp. 899-926.
- Shibley MT, Ennis M. (1996). Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol.* 30:123-176.
- Shibley M, Ennis M, Puche A (2004) Olfactory System. In: Paxinos G, ed. *The Rat Nervous System*. 3rd ed. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Sitia R, Meldolesi J. (1992). Endoplasmic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions. *Mol Biol Cell.* 3:1067-1072.
- Singer SJ, Nicolson GL. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175:720-731.
- Skeberdis VA, Lan J, Opitz T, Zheng X, Bennett M, Zukin RS. (2001). mGluR1-mediated potentiation of NMDA receptors involves a rise in intracellular calcium and activation of protein kinase C. *Neuropharmacology.* 40:856-865.
- Sladeczek F, Pin JP, Récasens M, Bockaert J, Weiss S. (1985). Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature.* 317:717-719.
- Smart EJ, Ying YS, Mineo C, Anderson RG. (1995). A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:10104-10108.
- Smith TC, Jahr CE. (2002). Self-inhibition of olfactory bulb neurons. *Nat Neurosci.* 5:760-766.
- Sobczyk A, Svoboda K. (2007). Activity-dependent plasticity of the NMDA-receptor fractional Ca<sup>2+</sup> current. *Neuron* 53:17-24.

- Soloviev MM, Ciruela F, Chan WY, McIlhinney RA. (1999). Identification, cloning and analysis of expression of a new alternatively spliced form of the metabotropic glutamate receptor mGluR1 mRNA1. *Biochim Biophys Acta*. 1446:161-166.
- Soloviev MM, Ciruela F, Chan WY, McIlhinney RA. (2000). Molecular characterisation of two structurally distinct groups of human homers, generated by extensive alternative splicing. *J Mol Biol*. 295:1185-1200.
- Spacek J. (1985). Three-dimensional analysis of dendritic spines. II. Spine apparatus and other cytoplasmic components. *Anat Embryol*. 171:235-243.
- Spacek J, Harris KM. (1997). Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci*. 17:190-203.
- Speers AE, Wu CC. (2007). Proteomics of integral membrane proteins--theory and application. *Chem Rev*.; 107: 3687-3714.
- Stewart WB, Kauer JS, Shepherd GM. (1979). Functional organization of rat olfactory bulb analysed by the 2-deoxyglucose method. *J Comp Neurol*. 185:715-734.
- Stone DM, Wessel T, Joh TH, Baker H. (1990). Decrease in tyrosine hydroxylase, but not aromatic L-amino acid decarboxylase, messenger RNA in rat olfactory bulb following neonatal, unilateral odor deprivation. *Brain Res Mol Brain Res*. 8:291-300.
- Storto M, de Grazia U, Knöpfel T, Canonico PL, Copani A, Richelmi P, Nicoletti F, Vairetti M. (2000). Selective blockade of mGlu5 metabotropic glutamate receptors protects rat hepatocytes against hypoxic damage. *Hepatology*. 31:649-655.
- Strasser U, Lobner D, Behrens MM, Canzoniero LM, Choi DW. (1998). Antagonists for group I mGluRs attenuate excitotoxic neuronal death in cortical cultures. *Eur J Neurosci*. 10:2848-2855.
- Sun J, Tadokoro S, Imanaka T, Murakami SD, Nakamura M, Kashiwada K, Ko J, Nishida W, Sobue K. (1998). Isolation of PSD-Zip45, a novel Homer/ves1 family protein containing leucine zipper motifs, from rat brain. *FEBS Lett*. 437:304-308.
- Suzuki T. (2002). Lipid rafts at postsynaptic sites: distribution, function and linkage to postsynaptic density. *Neurosci Res*. 44:1-9
- Tadokoro S, Tachibana T, Imanaka T, Nishida W, Sobue K. (1999). Involvement of unique leucine-zipper motif of PSD-Zip45 (Homer 1c/ves1-1L) in group 1 metabotropic glutamate receptor clustering. *Proc Natl Acad Sci*. 96:13801-13806.
- Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. (2001). Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci*. 21:RC182.
- Takamori S, Malherbe P, Broger C, Jahn R. (2002). Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep*. 3:798-803.
- Takeshita Y, Harata N, Akaike N. (1996). Suppression of K<sup>+</sup> conductance by metabotropic glutamate receptor in acutely dissociated large cholinergic neurons of rat caudate putamen. *J Neurophysiol*. 76:1545-1558.

- Takeuchi H, Kurahashi T. (2005). Mechanism of signal amplification in the olfactory sensory cilia. *J Neurosci*. 25:11084-11091.
- Tanabe Y, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Nakanishi S. (1992). A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron*. 8:169-179.
- Thomas U. (2002). Modulation of synaptic signalling complexes by Homer proteins. *J Neurochem*. 81:407-413.
- Toida K, Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T. (1996). Electron microscopic serial-sectioning/reconstruction study of parvalbumin-containing neurons in the external plexiform layer of the rat olfactory bulb. *Neuroscience*. 72:449-466.
- Toida K, Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T. (1998). Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: III. Structural features of calbindin D28K-immunoreactive neurons. *J Comp Neurol*. 392:179-198.
- Toida K, Kosaka K, Aika Y, Kosaka T. (2000). Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb--IV. Intraglomerular synapses of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons. *Neuroscience*. 101:11-17.
- Toresson H, Grant SG. (2005). Dynamic distribution of endoplasmic reticulum in hippocampal neuron dendritic spines. *Eur J Neurosci*. 22:1793-1798.
- Treloar HB, Feinstein P, Mombaerts P, Greer CA. (2002). Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *J Neurosci*. 22:2469-2477.
- Triller A, Choquet D. (2005). Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move!. *Trends Neurosci*. 28:133-139.
- Trombley PQ, Westbrook GL. (1990). Excitatory synaptic transmission in cultures of rat olfactory bulb. *J Neurophysiol*. 64:598-606.
- Tsuchiya D, Kunishima N, Kamiya N, Jingami H, Morikawa K. (2002). Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd<sup>3+</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:2660-2265.
- Tsuji Y, Shimada Y, Takeshita T, Kajimura N, Nomura S, Sekiyama N, Otomo J, Usukura J, Nakanishi S, Jingami H. (2000). Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J Biol Chem*. 275:28144-28151.
- Tu JC, Xiao B, Yuan JP, Lanahan AA, Leoffert K, Li M, Linden DJ, Worley PF. (1998). Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron*. 21:717-726.
- Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, Yuan JP, Petralia RS, Brakeman P, Doan A, Aakalu VK, Lanahan AA, Sheng M, Worley PF. (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron*. 23:583-592.

- Urban NN, Sakmann B. (2002). Reciprocal intraglomerular excitation and intra- and interglomerular lateral inhibition between mouse olfactory bulb mitral cells. *J Physiol.* 542:355-367.
- Van den Pol AN. (1994). Metabotropic glutamate receptor mGluR1 distribution and ultrastructural localization in hypothalamus. *J Comp Neurol.* 349:615-632.
- Van den Pol AN. (1995). Presynaptic metabotropic glutamate receptors in adult and developing neurons: autoexcitation in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 359:253-271.
- Van den Pol AN, Romano C, Ghosh P. (1995). Metabotropic glutamate receptor mGluR5 subcellular distribution and developmental expression in hypothalamus. *J Comp Neurol.* 362:134-150.
- Van Gehuchten and Martin. (1891). A. van Gehuchten and I. Martin, Le bulbe olfactif chez quelques mammiferes, *Cellule* 7: 203-300.
- Van Harreveld A. (1959). Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle. *J. Neurochem.* 3:300-315.
- Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nuñez JM, Vosshall LB, Axel R. (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell.* 79:981-991.
- Vignes M, Guiramand J, Sasseti I, Recasens M. (1992). Dithiotreitol specifically inhibits metabotropic responses of glutamate and depolarizing agents in rat brain synaptoneurosomes. *Neurochem Int.* 21:229-235.
- Villa A, Meldolesi J. (1994). The control of Ca<sup>2+</sup> homeostasis: role of intracellular rapidly exchanging Ca<sup>2+</sup> stores. *Cell Biol Int.* 18:301-307.
- Vissel B, Krupp JJ, Heinemann SF, Westbrook GL. (2001). A use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nat Neurosci.* 4:587-596.
- Vlachos A, Korkotian E, Schonfeld E, Copanaki E, Deller T, Segal M. (2009). Synaptopodin regulates plasticity of dendritic spines in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 29:1017-1033.
- Vucinić D, Cohen LB, Kosmidis EK. (2006). Interglomerular center-surround inhibition shapes odorant-evoked input to the mouse olfactory bulb in vivo. *J Neurophysiol.* 95:1881-1887.
- Wachowiak M, Shipley MT. (2006). Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol.* 17:411-23.
- Ward SM, Bormans AF, Manson MD. (2006). Mutationally altered signal output in the Nart (NarX-Tar) hybrid chemoreceptor. *J Bacteriol.* 188:3944-3951.
- Watson ML. (1958). Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *J Biophys Biochem Cytol.* 4:727-730.
- Wentholt RJ, Yokotani N, Doi K, Wada K. (1992). Immunochemical characterization of the non-NMDA glutamate receptor using subunit-specific antibodies. Evidence for a hetero-oligomeric structure in rat brain. *J Biol Chem.* 267:501-507.



- Wenzel A, Villa M, Mohler H, Benke D. (1996). Developmental and regional expression of NMDA receptor subtypes containing the NR2D subunit in rat brain. *J Neurochem.* 66:1240-1248.
- Weruaga E, Briñón JG, Porteros A, Arévalo R, Aijón J, Alonso JR. (2000). Expression of neuronal nitric oxide synthase/NADPH-diaphorase during olfactory deafferentation and regeneration. *Eur J Neurosci.* 12:1177-1193.
- Wilson DA, Guthrie KM, Leon M. (1990). Modification of olfactory bulb synaptic inhibition by early unilateral olfactory deprivation. *Neurosci Lett.* 116:250-256.
- Wilson DA, Wood JG. (1992). Functional consequences of unilateral olfactory deprivation: time-course and age sensitivity. *Neuroscience.* 49:183-192.
- Wilson DA. (1995). NMDA receptors mediate expression of one form of functional plasticity induced by olfactory deprivation. *Brain Res.* 677:238-242.
- Wilson DA, Sullivan RM. (1995). The D2 antagonist spiperone mimics the effects of olfactory deprivation on mitral/tufted cell odor response patterns. *J Neurosci.* 15:5574-5581.
- Wilson DA, Best AR, Brunjes PC. (2000). Trans-neuronal modification of anterior piriform cortical circuitry in the rat. *Brain Res.* 853:317-322.
- Wilson DA, Best AR, Sullivan RM. (2004). Plasticity in the olfactory system: lessons for the neurobiology of memory. *Neuroscientist.* 10:513-524.
- Wisden W, Seeburg PH. (1993a). Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 3:291-298.
- Wisden W, Seeburg PH. (1993b). A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci.* 13:3582-3598.
- Woo CC, Leon M. (1995a). Distribution and development of beta-adrenergic receptors in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 352:1-10.
- Woo CC, Leon M. (1995b). Early olfactory enrichment and deprivation both decrease beta-adrenergic receptor density in the main olfactory bulb of the rat. *J Comp Neurol.* 360:634-642.
- Woolf TB, Shepherd GM, Greer CA. (1991). Local information processing in dendritic trees: subsets of spines in granule cells of the mammalian olfactory bulb. *J Neurosci.* 11:1837-1854.
- Wreggett KA, Wells JW. (1995). Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors. *J Biol Chem.* 270:22488-22499.
- Wu HY, Lynch DR. (2006). Calpain and synaptic function. *Mol Neurobiol.* 33:215-36.
- Xiao B., Tu J.C., Petralia R.S., Yuan J.P., Doan A., Breder C.D., et al. (1998) Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of Homer-related, synaptic proteins. *Neuron.* 21:707-716.
- Xiao B, Tu JC, Worley PF. (2000). Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function. *Curr Opin Neurobiol.* 10:370-374.

- Yuan Q, Knöpfel T. (2006). Olfactory nerve stimulation-evoked mGluR1 slow potentials, oscillations, and calcium signaling in mouse olfactory bulb mitral cells. *J Neurophysiol.* 95:3097-3104.
- Záborszky L, Carlsen J, Brashear HR, Heimer L. (1986). Cholinergic and GABAergic afferents to the olfactory bulb in the rat with special emphasis on the projection neurons in the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band. *J Comp Neurol.* 243:488-509.
- Zamanillo D, Sprengel R, Hvalby O, Jensen V, Burnashev N, Rozov A, Kaiser KM, Köster HJ, Borchardt T, Worley P, Lübke J, Frotscher M, Kelly PH, Sommer B, Andersen P, Seeburg PH, Sakmann B. (1999). Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science.* 284:1805-1811.
- Zheng YZ, Foster LJ. (2009). Contributions of quantitative proteomics to understanding membrane microdomains. *J Lipid Res.* 50:1976-1985.
- Zhu H, Ryan K, Chen S. (1999). Cloning of novel splice variants of mouse mGluR1. *Brain Res Mol Brain Res.* 73:93-103.
- Zilles K. (1992). Neurotransmitter receptors in the forebrain: regional and laminar distribution. *Prog Histochem Cytochem.* 26:229-240.