



UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS**

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**MOVIMIENTOS INTRACELULARES DE Ca^{2+}
ESPONTÁNEOS Y SINCRÓNICOS EN REDES DE
COMUNICACIÓN CELULAR DEL BULBO
OLFATORIO DE LA RATA.**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

FRANCISCO JONATHAN PÉREZ DELGADO

Hermosillo, Sonora, México

Diciembre de 2021

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

MOVIMIENTOS INTRACELULARES DE Ca^{2+} ESPONTÁNEOS Y SINCRÓNICOS EN
REDES DE COMUNICACIÓN CELULAR DEL BULBO OLFATORIO DE LA RATA

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

Q.B.C. FRANCISCO JONATHAN PÉREZ DELGADO

Hermosillo, Sonora, México.

Diciembre de 2021.

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada MOVIMIENTOS INTRACELULARES DE Ca^{2+} ESPONTÁNEOS Y SINCRÓNICOS EN REDES DE COMUNICACIÓN CELULAR DEL BULBO OLFATORIO DE LA RATA presentada por Francisco Jonathan Pérez Delgado, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



Dr. Marcelino Montiel Herrera

Director



Dr. Enrique de la Re Vega

Codirector



Dr. Marco Antonio López Torres

Secretario



Dr. Daniel Reyes Haro

Sinodal externo

DEDICATORIA

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios de posgrado.

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora y al Posgrado en Biociencias por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Al Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora por permitirme realizar mi trabajo experimental en sus instalaciones.

A mi director de tesis el Dr. Marcelino Montiel Herrera, por su amistad, paciencia, apoyo, consejos y asesoramiento durante mi estancia en la maestría.

Al Dr. Enrique de la Re Vega por su amistad, apoyo, consejos y por el aprendizaje académico.

A mis sinodales el Dr. Marco Antonio López Torres y el Dr. Daniel Reyes Haro, por sus valiosas observaciones, consejos, apoyo y el tiempo dedicado a este proyecto de investigación.

A mi familia por su apoyo y por ayudarme a ser la persona que soy actualmente.

A Rebeca Dórame por apoyarme en todo, por su cariño, paciencia y por motivarme a salir adelante en todo lo que me proponga.

A mis amigos de la licenciatura, por su amistad y todos los momentos divertidos que pasamos durante este periodo de tiempo.

A mis amigos de la maestría, por los buenos momentos que compartimos durante el posgrado, sus buenos consejos y por el aprendizaje académico.

A mis compañeros de laboratorio por el apoyo y convivencias que tuvimos durante este tiempo.

RESUMEN

Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y sincrónicos se producen en diferentes tipos celulares durante la comunicación de las redes celulares del bulbo olfatorio de la rata. En este trabajo, se investigó si los movimientos intracelulares de Ca^{2+} se sincronizaban en tiempo y espacio entre la capa plexiforme interna, la capa de las células mitrales y la capa plexiforme externa del bulbo olfatorio de rata (P7-21). Para ello, primero se registraron los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos en la capa plexiforme externa e interna y en la capa mitral de cortes coronales del bulbo olfatorio de rata. El análisis de los resultados mostró que el 13% ($n = 59/456$) de las células del bulbo olfatorio generó movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos de 3.75 ± 1.28 mHz con 2 mM de Ca^{2+} extracelular. Mientras que, la remoción de éste generó que solamente el 4% ($n = 5/132$) de las células tuvieran movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos de 1.21 ± 0.44 mHz. La sincronización temporal de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} se generó en el 47% ($n = 28/59$) de las células en presencia de Ca^{2+} extracelular mientras que, en ausencia de éste, el 72% ($n = 15/22$) de las células sincronizó temporalmente los movimientos intracelulares de Ca^{2+} con distancias de 67 ± 45 μm ($n = 28$) de separación entre las células. Los estudios farmacológicos con 2-APB sugieren la participación de receptores de IP_3 en la generación de movimientos intracelulares de Ca^{2+} . Asimismo, se encontró que 5% de astrocitos en el bulbo olfatorio generó movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos.

ABSTRACT

Spontaneous and synchronous Ca^{2+} transients are produced in different cell types during the communication of the cellular networks of the rat olfactory bulb. In this work, it was investigated whether the Ca^{2+} transients were synchronized in time and space between the inner plexiform layer, the mitral cell layer, and the external plexiform layer of the rat olfactory bulb (P7-21), during the processing of the olfactory information. To do this, spontaneous Ca^{2+} transients were recorded in the external and inner plexiform layer and in the mitral layer of coronal slices of the rat olfactory bulb. The analysis of the results showed that 13% ($n = 59/456$) of the olfactory bulb cells generated spontaneous Ca^{2+} transients of 3.75 ± 1.28 mHz using 2 mM extracellular Ca^{2+} . Meanwhile, the removal of the extracellular calcium generated that only 4% ($n = 5/132$) of the cells produced spontaneous Ca^{2+} transients of 1.21 ± 0.44 mHz. The temporal synchronization of the Ca^{2+} transients was generated in 47% ($n = 28/59$) of the cells in the presence of extracellular Ca^{2+} while, in the absence of this one, the 72% ($n = 15/22$) of the cells temporally synchronized Ca^{2+} transients with distances of 67 ± 45 μm ($n = 28$) of separation between cells. Pharmacological studies using 2-APB suggest that Ca^{2+} transients are induced by activation of IP_3 receptors. Moreover, we found that the 5% of the cells that generated spontaneous Ca^{2+} transients are astrocytes.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	4
I.1. Bulbo olfatorio	5
I.2. Astrocitos	6
I.3. Reservorios intracelulares de Ca ²⁺	11
I.4. Movimientos intracelulares de Ca ²⁺ en células gliales	12
I.5. Movimientos intracelulares de Ca ²⁺ en neuronas	13
I.6. Movimientos intracelulares de Ca ²⁺ sincrónicos	14
II. HIPÓTESIS	16
III. OBJETIVOS	17
III.1. Objetivo general	17
III.2. Objetivos específicos	17
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	18
IV.1. Disección de bulbo olfatorio	18
IV.2. Registro de movimientos intracelulares de Ca ²⁺	18
IV.3. Análisis de los movimientos intracelulares de Ca ²⁺ sincrónicos	20
IV.4. Inmunohistoquímica	20
IV.5. Impregnación Golgi-Cox rápida	21
IV.6. Procesamiento de tejido para histología	21
IV.7. Tinción hematoxilina-eosina	21
IV.8. Análisis de datos	22

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	23
V.1. Movimientos intracelulares de Ca ²⁺ espontáneos	23
V.2. Movimientos intracelulares de Ca ²⁺ sincronizados	31
V.3. Farmacología de los movimientos intracelulares de Ca ²⁺ espontáneos ...	37
V.4. Movimientos intracelulares de Ca ²⁺ inducidos por agonistas	42
V.5. Inmunohistoquímica	50
V.6. Histología del BO	52
VI. CONCLUSIÓN	59
VII. RECOMENDACIONES	60
VIII. LITERATURA CITADA	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Diferenciación en el sistema nervioso central: neuronas y glía	4
2	Morfología del BO en corte coronal	5
3	Función de los astrocitos en el SNC	7
4	Sinapsis tripartita	9
5	Canales de Ca^{2+} en la membrana de los astrocitos	9
6	Reservorios intracelulares de Ca^{2+} en células gliales	11
7	Movimientos intracelulares de Ca^{2+} en células gliales	13
8	Movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos en células de BO	25
9	Histograma comparativo de latencia, crecimiento y decaimiento exponencial de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos de las células de BO, en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular. Diferencias significativas de latencia entre los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos en presencia y ausencia de Ca^{2+}_E , $p = 0.0058$	27
10	Movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincrónicos en células de BO	33
11	Distribución de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincrónicos en células de BO en función de la amplitud contra el tiempo	34
12	Farmacología de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos en BO P11	38
13	Movimientos intracelulares de Ca^{2+} inducidos por 2-APB en células de BO de rata P11	40
14	Movimientos intracelulares de Ca^{2+} inducidos por agonistas	45
15	Inmunohistoquímica para la identificación de la GFAP en BO	51
16	Histología de BO de rata en corte coronal con impregnación Golgi-Cox rápida y hematoxilina-eosina	53
17	Representación de distintas vías de activación de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en células del BO de la rata postnatal	58

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Prueba de Bonferroni para identificar diferencias significativas entre los grupos de células que respondieron a 1 mM de ATP, 20 mM de K^+ , 1 mM de D-serina y 1 μ M de ácido acético. Se muestran diferencias significativas entre el grupo de células estimulado con 20 mM de K^+ y el grupo de células estimulado con ácido acético	46
2	Correlación positiva entre las células que generan movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y las células identificadas como astrocitos (GFAP+), con un nivel de significancia de $p = 0.04$	52

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central (SNC) está formado por diferentes estructuras como los bulbos olfatorios, las cortezas cerebrales, el cerebelo, el tallo cerebral y la médula espinal. Todas éstas compuestas por una amplia gama de células, principalmente por neuronas y células gliales. Las primeras se consideran células excitables ya que tienen la capacidad de despolarizar sus membranas celulares (activando canales de Na^+ y Ca^{2+} voltaje-dependientes en milésimas de segundo durante la transmisión sináptica). Este fenómeno de comunicación celular es exclusivo del sistema nervioso (SN) en vertebrados e invertebrados y caracteriza la función de las células neuronales en el cerebro.

Las células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y microglía) son las más abundantes en el SN y desempeñan funciones especializadas de comunicación celular (Shepherd *et al.*, 2011; Mombaerts *et al.*, 1996; Araque *et al.*, 2010). Por ejemplo, las células gliales son consideradas como células no excitables eléctricamente, debido a que no expresan en cantidad los mismos tipos de canales de Na^+ y Ca^{2+} voltaje-dependientes en sus membranas celulares, en comparación con las neuronas. Sin embargo, estas células son responsables de mantener la homeostasis de K^+ extracelular en el SN, de modular el desarrollo y migración de neuronas, modular la concentración de neurotransmisores en el espacio sináptico y el flujo local de sangre en la unión neurovascular en el SN (Schousboe, 2003; Zonta *et al.*, 2003; Montiel-Herrera *et al.*, 2019). Particularmente, los astrocitos se caracterizan por generar olas intracelulares de Ca^{2+} [1-100 μM] que pueden propagarse de manera oscilatoria por 5-30 min en frecuencias de 10-110 mHz a través del SN (Imai, 2014).

Las células gliales del bulbo olfatorio (BO), propagan movimientos intracelulares de Ca^{2+} de una célula a otra a través de uniones comunicantes (uniones gap) para formar una red de comunicación celular. Está demostrado que la comunicación de Ca^{2+} entre astrocito-oligodendrocito a través de uniones intercelulares, regula el diámetro de los vasos sanguíneos lo que conlleva a la modulación del flujo local de sangre en el BO (Deitmer *et al.*, 1998; Stavermann *et al.*, 2015). Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} son mediados por diferentes macromoléculas, como los receptores para el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-

isoxazolpropiónico (AMPA), bomba Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA), molécula de interacción estromal (STIM1) y la proteína 1 del canal de Ca^{2+} activado por la liberación de Ca^{2+} expresado por el gen ORA1 (Beiersdorfer *et al.*, 2019; Beck *et al.*, 2004; Hogan *et al.*, 2010; Soboloff *et al.*, 2012). También participan segundos mensajeros como el inositol trifosfato (IP_3) y Ca^{2+} , para generar los movimientos intracelulares de Ca^{2+} (Galione y Ruas, 2005; Hamilton, 2005). Este tipo de señalización por Ca^{2+} está implicada en la apoptosis y la expresión de genes (Metea y Newman, 2006; Xu *et al.*, 2007; Berridge *et al.*, 2003). Asimismo, los movimientos intracelulares de Ca^{2+} pueden generar patrones espaciotemporales de sincronización, que son utilizados por las células del BO para decodificar los olores. Particularmente, cuando se detecta un olor por las NSO la información viaja hacia el glomérulo olfativo, donde la sincronización se realiza entre las interneuronas (células mitrales/penacho) del BO que se comunican con un mismo glomérulo, funcionando como una comunicación excitatoria-inhibitoria capaz de regular el procesamiento de la información y su transferencia hacia las diferentes regiones del cerebro asociadas con el olfato (Chen *et al.*, 2009). Por ello, se cuestiona si la información electroquímica generada por sinapsis específicas es detectada por las células que rodean los circuitos celulares a través de códigos de señalización celular como, por ejemplo, los movimientos intracelulares de Ca^{2+} que generan las neuronas y las células gliales (Stobart *et al.*, 2018). En particular, los distintos tipos de células que componen estructuras como el BO, la corteza cerebral y el hipocampo, entre otras más, se comunican básicamente a través de transmisión electroquímica. Martín-Fernández *et al.*, (2017), han mostrado en preparaciones de hipocampo y amígdala, que los astrocitos son capaces de liberar gliotransmisores como adenosina trifosfato (ATP) y glutamato para modular la comunicación sináptica. Adicionalmente, se ha mostrado que subpoblaciones de astrocitos en el estriado dorsal de los roedores, responden de manera selectiva a la señalización sináptica de neuronas específicas (Martín *et al.*, 2015).

Stuart y Sakmann (1994), mostraron que una neurona piramidal computa información sináptica en su dendrita apical y es modulada por el soma neuronal para decidir si se inicia un potencial de acción en el segmento inicial del axón. Posteriormente, las investigaciones realizadas por Jonas y Bischofberger (1997), demostraron que las células mitrales del BO de rata mantienen una propagación activa del potencial de acción mediante canales de Na^+

dependientes de voltaje, mostrando que los canales de K^+ dependientes de voltaje son mediadores para una rápida repolarización de los potenciales de acción dendríticos, esto favorece la comunicación del BO ya que se puede desencadenar la liberación rápida de transmisores en las sinapsis dendrodendríticas.

En el BO, las neuronas sensoriales olfativas (NSO) detectan olores mediante receptores específicos a sustancias volátiles y transforman dicha información sensitiva a neurotransmisión glutamatérgica hacia la postsinapsis para generar estímulos excitantes (Murphy *et al.*, 2005). Posteriormente, se genera una “sinapsis recíproca” que conlleva a una liberación de ácido gama-aminobutírico (GABA) para interrumpir la comunicación sináptica entre las neuronas (Murphy *et al.*, 2005; Covelo y Araque, 2018), evento que se repite tras la activación de un receptor olfativo. En este contexto, se propone estudiar un modelo celular *in situ* de BO que involucre a neuronas cerebrales y células gliales que resulte accesible para evaluar los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y los movimientos de Ca^{2+} sincronizados en tiempo y espacio durante la comunicación celular del BO.

I. ANTECEDENTES

El BO, se origina por la elongación de las células en la parte interna del ectodermo. El engrosamiento del ectodermo produce la plácoda olfativa, la cual da lugar al epitelio olfativo y a la formación de células gliales (Park y Saint-Jeannet, 2010; Shiau *et al.*, 2011; Duque, 2003). Las células neuroepiteliales se forman a partir del ectodermo, convirtiéndose en células multipotenciales que posteriormente se pueden diferenciar en distintos tipos de células gliales y neuronas (Sadler, 2010). Las células multipotenciales se dividen en tres tipos: los neuroblastos, neuro-glioblastos y glioblastos (**Figura 1**). Los neuroblastos se diferencian a neuronas, mientras que los neuro-glioblastos y los glioblastos forman neuronas y células gliales (Ortuño-Sahagún *et al.*, 2011). La glía radial, es un precursor importante ya que puede diferenciarse tanto a neuronas y astrocitos. Además, las células neuroepiteliales pueden producir células endimarias cuando la producción y diferenciación de glioblastos y neuroblastos se detiene (Sun *et al.*, 2003).

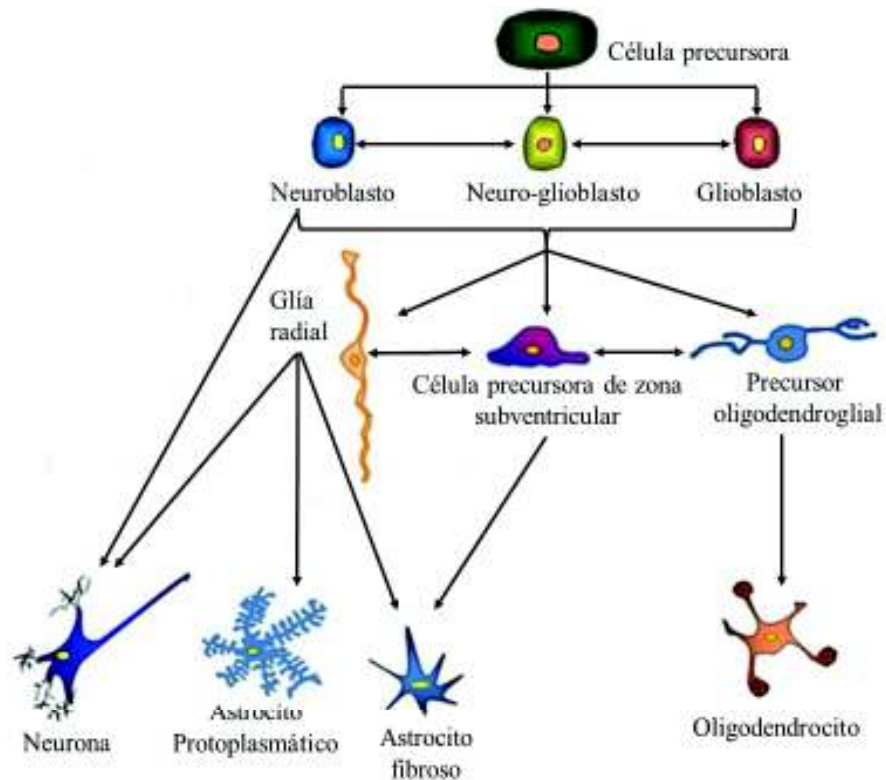


Figura 1. Diferenciación en el sistema nervioso central: neuronas y glía (modificado de Ortuño-Sahagún *et al.*, 2011).

I.1. Bulbo Olfatorio

El BO se caracteriza por ser dos prominencias de tejido que se encuentran en la parte frontal del cerebro de la rata. Esta estructura presenta diferentes capas de organización celular, representadas en la **Figura 2** (Paxinos y Watson, 2018). La capa más externa del BO se conoce como glomerular, caracterizada por estructuras esféricas denominadas glomérulos y que sirven como mediadores de la comunicación celular entre las NSO y las interneuronas del BO; además cuenta con la presencia de células juxtglomerulares (células de axón corto y las células periglomerulares) que mantienen la comunicación inhibitoria y excitadora con las células mitrales/penacho. Además, éstas producen la inhibición lateral en la capa glomerular gracias a que estas células mantienen contacto con diferentes glomérulos a la vez, favoreciendo la comunicación con las interneuronas (Whitesell *et al.*, 2013).

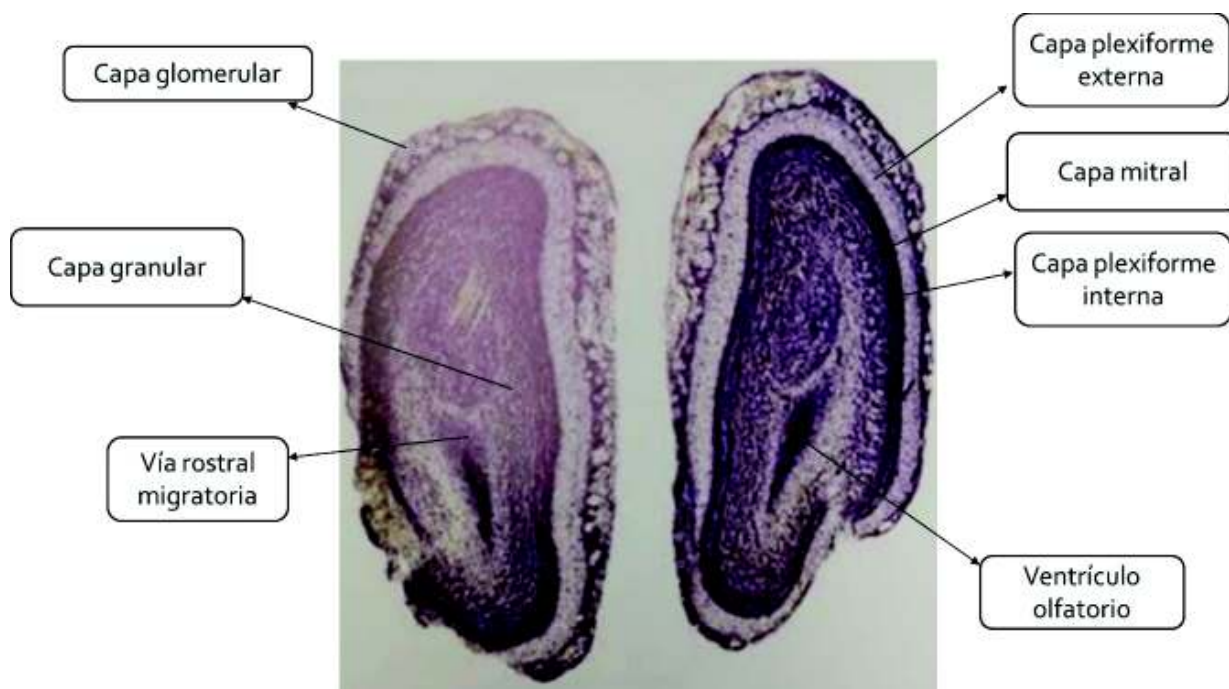


Figura 2. Morfología del BO en corte coronal (modificado de Paxinos y Watson, 2018).

La capa plexiforme externa se caracteriza por contener células gliales, periglomerulares y en penacho, estas últimas regulan la comunicación sináptica proveniente de las NSO. La comunicación entre las células mitrales y las células en penacho es recíproca, se produce en las dendritas secundarias de estas interneuronas y mantienen la comunicación con las células

granulares (Mori *et al.*, 1983). La capa mitral caracterizada por contener células mitrales, son las encargadas de llevar la información olfativa hacia diferentes regiones del cerebro que están asociadas al olfato (Jonas y Bischofberger, 1997). Dentro de la capa granular, se encuentran las células granulares que regulan la comunicación con las células mitrales, liberando ácido gamma-aminobutírico (GABA) hacia las interneuronas (Orona *et al.*, 1983). Las células profundas de axón corto mantienen la comunicación con la corteza olfatoria y son las encargadas de regular la actividad de las células mitrales, en penacho y granulares (Price y Powell, 1970; Markopoulos *et al.*, 2012).

El BO cuenta con una vía rostral migratoria y ventrículo olfatorio, que se encargan de la migración de las células nuevas hacia el BO y del flujo del líquido cefalorraquídeo, respectivamente. La vía rostral migratoria es de suma importancia a lo largo de la vida de la rata, ya que cada día en ratas adultas, se produce un estimado de 10,000 células que servirán de reemplazo para las células granulares que se encuentran acopladas en el “circuito olfativo” y que son separadas de la red celular cuando inician la apoptosis (Petreanu y Alvarez, 2002). Las células nuevas se producen en la zona subventricular y después viajan a través de la vía rostral migratoria hasta llegar al BO. Se estima que solamente la mitad de las células que llegan al BO logran formar una conexión eficiente con las células (Merkle *et al.*, 2007). Dentro del BO, las células gliales se encuentran distribuidas ampliamente por todo el tejido, realizando diferentes funciones que se van a detallar en las siguientes secciones.

I.2. Astrocitos

Los astrocitos son las células más abundantes del sistema nervioso central (Tower y Young, 1973; Kastanenka *et al.*, 2020) y se estima que un tercio de la masa del cerebro pertenece a este tipo de células (Kandel, 2000; Verkhratsky y Nedergaard, 2018). Estas células realizan diversas funciones dentro del SNC (**Figura 3**), como proporcionar apoyo metabólico captando glucosa del medio extracelular y almacenándola en forma de glucógeno. La glucosa se degrada a través de la glucólisis aeróbica, donde la enzima lactato deshidrogenasa 5 (LDH-5 exclusiva de astrocitos) convierte lactato a piruvato. Este último es liberado al medio extracelular para ser captado por las neuronas, y una vez dentro de ellas, el lactato se convierte a piruvato para dar

comienzo al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Pellerin y Magistretti, 1994; Alberini *et al.*, 2018).

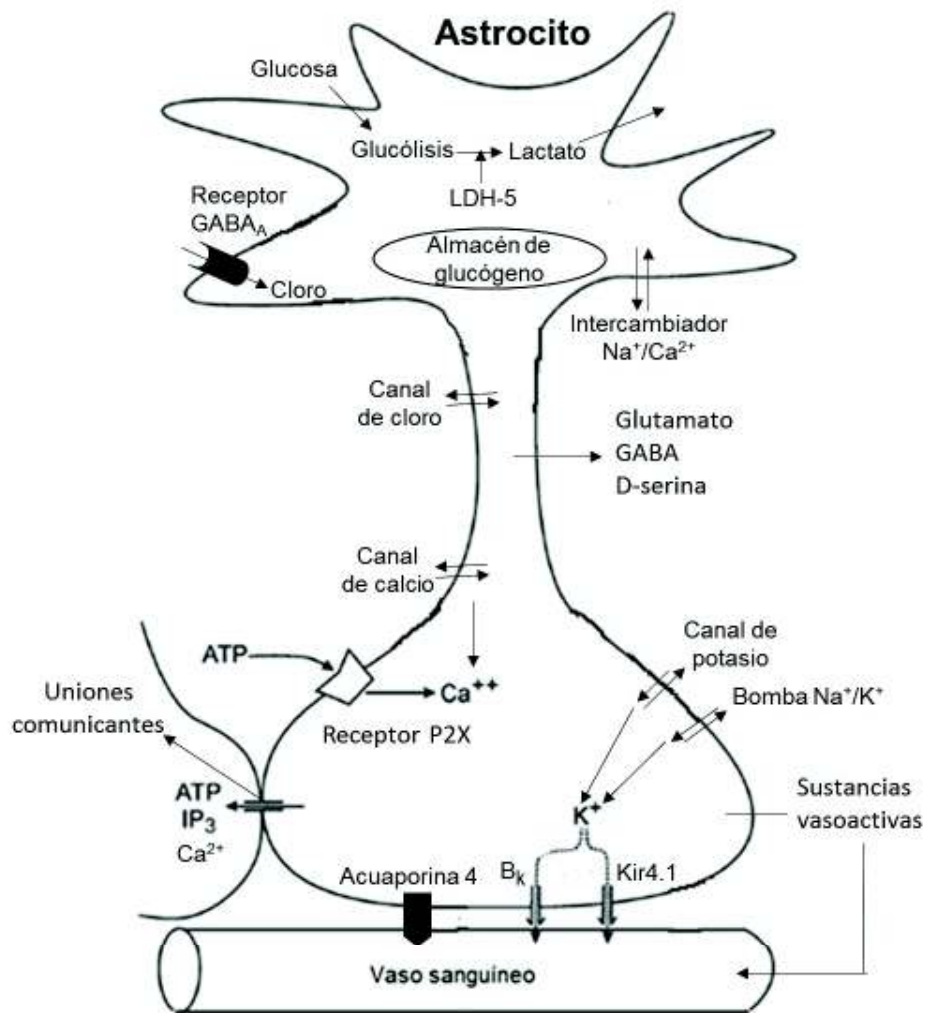


Figura 3. Función de los astrocitos en el SNC (modificado de Simard y Nedergaard, 2004).

Los astrocitos modulan el diámetro de los vasos sanguíneos secretando diferentes sustancias como vasodilatadores (ácido araquidónico) y vasoconstrictores (ciclooxygenasa, prostaglandina F2, tromboxano A-II), estas sustancias se transmiten gracias a la interacción que existe entre los astrocitos y las células epiteliales de los vasos sanguíneos (Zonta *et al.*, 2003; Iadecola y Nedergaard 2007). Una función importante en los astrocitos es mantener la homeostasis local de iones como el K⁺ mediante canales de rectificación tardía (Kir4.1) o

canales de K^+ de alta conductancia (B_k), intercambiadores de iones (Na^+ / Ca^{2+}), bombas que hidrolizan ATP para transportar iones al interior y exterior de las células. Los astrocitos expresan receptores para ácido gamma-aminobutírico de tipo A ($GABA_A$) que, al activarse, favorecen la entrada de Cl^- hacia el interior de la célula (Schousboe 2003; Huang y Bergles 2004; Serrano *et al.*, 2006).

Los astrocitos participan en la sinapsis, este fenómeno se conoce como “sinapsis tripartita” (**Figura 4**), que es la interacción entre la neurona presináptica, el astrocito y la neurona postsináptica (Araque *et al.*, 1999), esta interacción es favorecida gracias a que liberan diferentes gliotransmisores como el ATP, glutamato, IP_3 , Ca^{2+} , GABA y D-serina para comunicarse con otras células (Bezzi *et al.*, 2004; Perea y Araque, 2007; Savtchouk y Volterra, 2018). Los astrocitos también expresan en su membrana diferentes receptores que reconocen moléculas que liberan otras células. Para glutamato, expresan receptores ionotrópicos como los receptores AMPA, ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) y kainato, también expresan receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) como mGluR₁, mGluR₃ y mGluR₅ (Parpura *et al.*, 2011). La D-serina se une al sitio de glicina de los receptores NMDA, produciendo la apertura del canal y permitiendo el paso de iones de Ca^{2+} al medio intracelular. El ATP es captado mediante receptores de nucleótidos (P2X). Por ello, estas células juegan un papel importante en la actividad y el desarrollo neuronal (Baudoux y Parker, 2008; Perea y Araque, 2010).

Los astrocitos expresan diversos tipos de canales y receptores que intervienen en la homeostasis y el paso del Ca^{2+} desde el medio extracelular hacia el medio intracelular (**Figura 5**), como canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) de tipo N, L, R y T (Latour *et al.*, 2003), receptores de potencial transitorio (TRP) de tipo TRPA1, TRPC1, TRPC4, TRPC5 y TRPV, aunque los TRP no son canales específicos para el Ca^{2+} , también permiten la entrada de Na^+ hacia el interior de la célula (Verkhatsky *et al.*, 2013a; Owsianik *et al.*, 2006). Los TRP responden a la estimulación mecánica, el cambio de temperatura y la activación de estos receptores puede generar movimientos intracelulares de Ca^{2+} en los astrocitos (Butenko *et al.*, 2012).

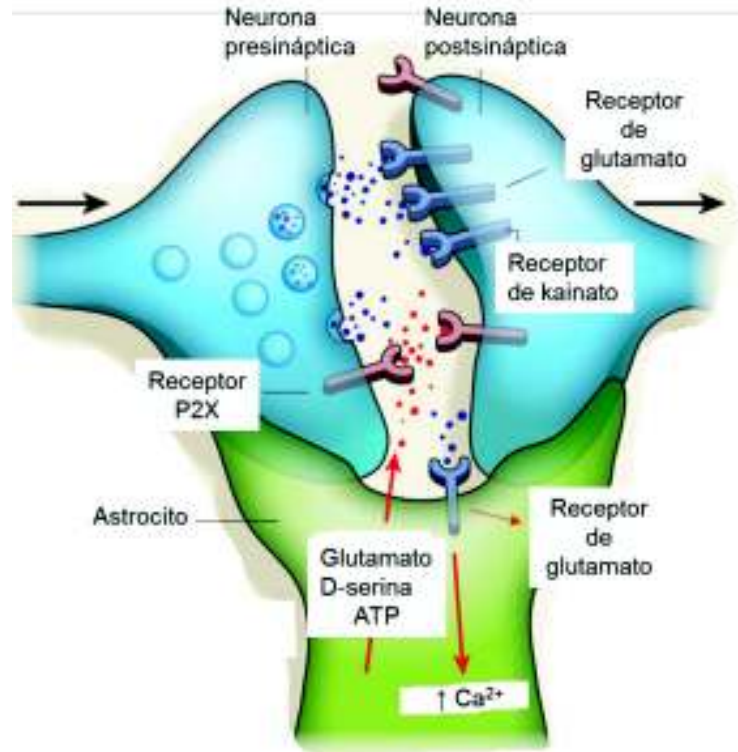


Figura 4. Sinapsis tripartita (modificado de Allen y Barres, 2009).

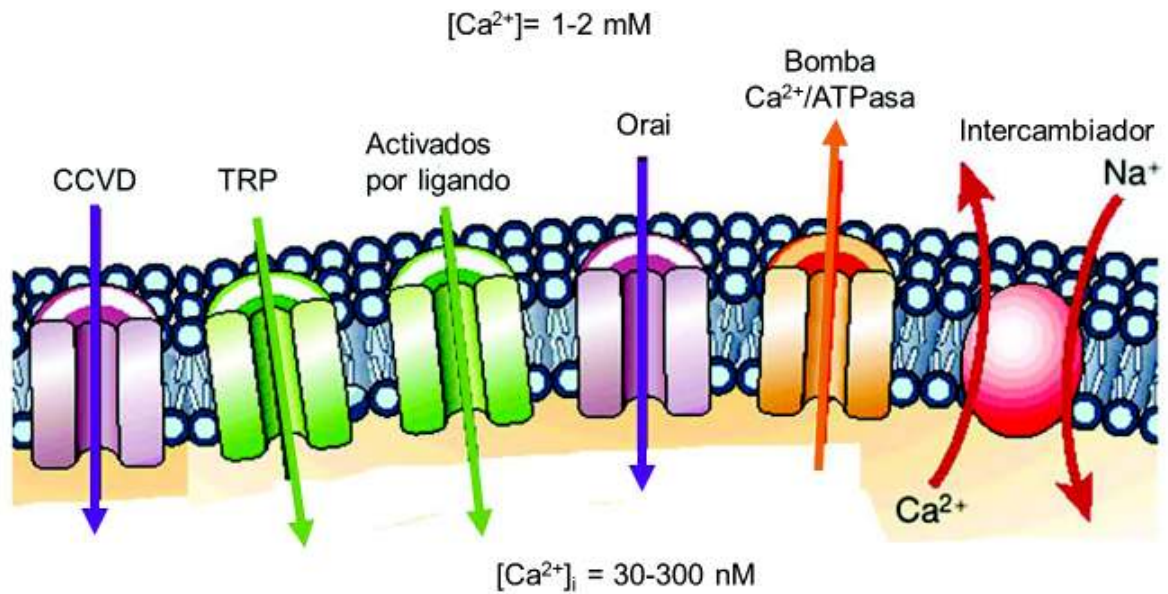


Figura 5. Canales de Ca^{2+} en la membrana de los astrocitos (modificado de Marbán, 2002).

Dentro de las células, el Ca^{2+} se mantiene en un rango de concentración de 30-300 nanomolar (nM) para evitar que se aglomeren proteínas en el medio intracelular y que éstas se vean alteradas o pierdan funcionalidad (Verkhratsky *et al.*, 1998). Por ello, los astrocitos tienen mecanismos para expulsar Ca^{2+} mediante bombas que hidrolizan ATP, las cuales aprovechan el gasto energético para liberar Ca^{2+} en contra de su gradiente electroquímico como lo hace la bomba $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPasa}$ de membrana plasmática (PMCA), expresando en su membrana las isoformas 1 y 2. La bomba PMCA, expulsa un ion de Ca^{2+} por cada molécula de ATP hidrolizada (Fresu *et al.*, 1999; Blaustein *et al.*, 2002). Otro de los mecanismos de los astrocitos para expulsar el Ca^{2+} hacia el medio extracelular, es el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) en el que por cada tres iones de Na^+ que entran, sale un ion de Ca^{2+} , pero el intercambio puede ser reversible dependiendo del gradiente electroquímico, esto produce la entrada de Ca^{2+} y la salida de Na^+ . Los astrocitos expresan las isoformas 1, 2 y 3 del intercambiador NCX (Minelli *et al.*, 2007; Verkhratsky *et al.*, 2018; Rose *et al.*, 2020).

Los canales activados por ligando que expresan los astrocitos son los receptores ionotrópicos que se activan por diversas sustancias como la acetilcolina, GABA_A , glicina, glutamato y ATP (Verkhratsky *et al.*, 2013b). Por otra parte, expresan receptores metabotrópicos, como los receptores acoplados a proteínas G que se encargan de activar a la proteína G y a su vez, ésta activa a la enzima fosfolipasa C para hidrolizar el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato para producir diacilglicerol (DAG) e IP_3 . Este último, se une a receptores de IP_3 (IP_3R_2) del retículo endoplásmico (RE) lo que conlleva a la apertura del canal iónico, liberando Ca^{2+} fuera del retículo produciendo incrementos en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Temple y Jones, 2007; Hamilton *et al.*, 2008). Cuando el RE libera Ca^{2+} , se activa el complejo STIM1/ORAI1 para evitar que el RE se quede sin Ca^{2+} , este mecanismo se da mediante canales de Ca^{2+} activados por vaciamiento de almacenes intracelulares (SOCE). La proteína STIM, funciona como un sensor cuando el RE comienza a liberar Ca^{2+} , esto conlleva a que STIM forme una interacción de tipo proteína-proteína con ORAI1, el cual es un canal de Ca^{2+} de membrana, lo que produce la entrada de iones de Ca^{2+} hacia el interior de la célula. Hay evidencia que sugiere que la activación de ORAI1 y ORAI3 con STIM1, participa mayoritariamente en la entrada de Ca^{2+} a los astrocitos (Kraft, 2015; Kwon *et al.*, 2017). Una vez activado el SOCE, el

Ca^{2+} del medio intracelular es introducido al RE por diversos mecanismos, los cuales se describen en la siguiente sección.

I.3. Reservorios intracelulares de Ca^{2+}

Las células tienen la capacidad de almacenar Ca^{2+} dentro de los organelos celulares (**Figura 6**), esta una de las formas que tienen las células para regular la concentración intracelular de Ca^{2+} . Dentro de las estructuras que forman parte de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} , se encuentra el RE y en su interior la concentración de este ion se encuentra entre 600-800 μM . Para poder introducir el Ca^{2+} hacia el interior del RE, se necesita de la acción de la bomba SERCA. Esta bomba tiene la capacidad de introducir 2 iones de Ca^{2+} por cada molécula de ATP hidrolizada y está mostrado que, en el SNC, se expresa la bomba SERCA tipo 2. Para liberar Ca^{2+} del retículo, se necesita la activación de receptores ionotrópicos como los de rianodina (RyR) y de IP_3 (Yamada *et al.*, 1970; Baba-Aissa *et al.*, 1998; Kovacs *et al.*, 2005).

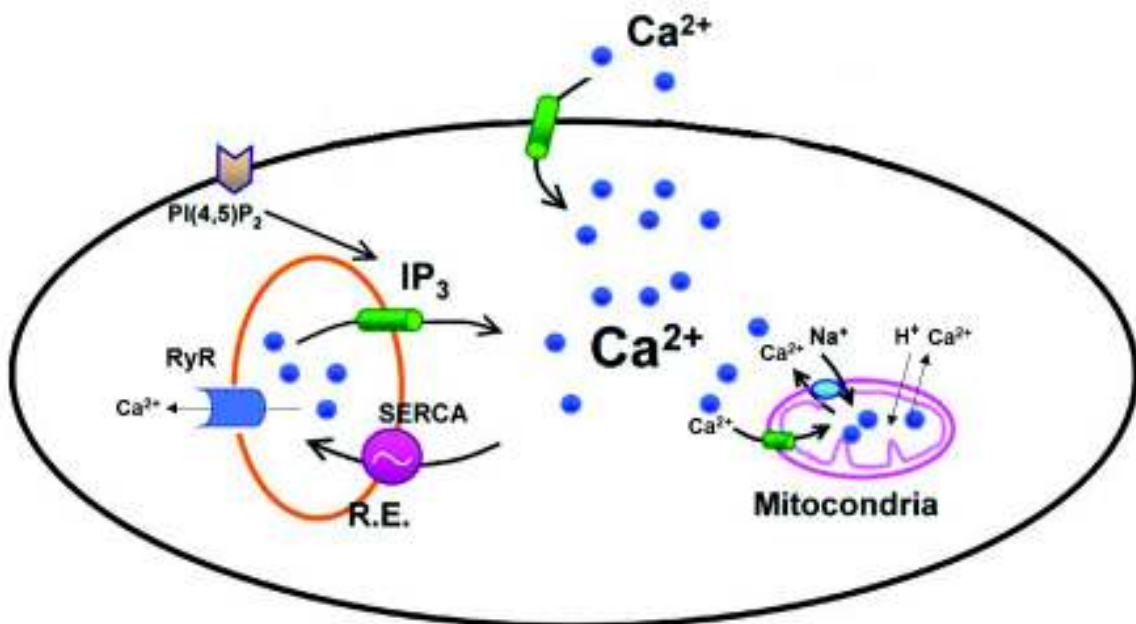


Figura 6. Reservorios intracelulares de Ca^{2+} en células gliales (modificado de Camello *et al.*, 2000).

Las mitocondrias también almacenan Ca^{2+} a través de las interacciones de las proteínas mitofusina 2, expresadas en las membranas tanto de los RE y las mitocondrias. De este modo, cuando el RE libera Ca^{2+} , éste es captado por las mitocondrias. Además, cuentan con un uniportador que introduce Ca^{2+} a la mitocondria. Este organelo libera Ca^{2+} utilizando intercambiadores, como el de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (Reyes y Parpura, 2008; Bakowski *et al.*, 2012; Verkhratsky *et al.*, 2018).

I.4. Movimientos intracelulares de Ca^{2+} en células gliales

Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} pueden ser generados por efecto de la actividad extracelular, ya sea por la acción de neurotransmisores, ATP, variaciones en la concentración extracelular de Ca^{2+} y de K^+ , produciendo la activación de receptores ionotrópicos y metabotrópicos que consecuentemente aumentan la concentración intracelular de Ca^{2+} . Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} generados por acción del glutamato, pueden ser inducidos por neuronas y astrocitos (Verkhratsky *et al.*, 1998; Hsia *et al.*, 1999; Beck *et al.*, 2004; Reyes y Parpura, 2008; Verkhratsky *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2020). Hay evidencia que sugiere que los TRPA1 participan en la generación de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y se considera que junto con la bomba SERCA, mantienen dicha actividad espontánea (Scemes y Giaume, 2006; Palygin *et al.*, 2010; Shigetomi *et al.*, 2013). Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} también pueden ser generados por la actividad intracelular, producida por la bomba SERCA, la activación de receptores ionotrópicos como STIM1/ORAI1 y ORAI3, receptores de IP_3 . Los receptores metabotrópicos, son receptores acoplados a proteínas G y cuando son activados, desencadenan la producción de IP_3 y DAG por acción de la enzima fosfolipasa C (PLC), el IP_3 interactúa con sus receptores presentes en la membrana del RE y produciendo la liberación de Ca^{2+} (Kovacs *et al.*, 2005; Kraft, 2015).

Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} pueden modular la actividad y plasticidad neuronal. De este modo, en preparaciones de hipocampo se demostró que los movimientos intracelulares de Ca^{2+} pueden ser independientes de la actividad neuronal y de la activación de receptores de glutamato (Spitzer *et al.*, 1995; Parri *et al.*, 2001; Nett *et al.*, 2002). En áreas corticales, los movimientos intracelulares de Ca^{2+} favorecen el desarrollo de circuitos

neuronales y regulan el crecimiento axonal (Garaschuk *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2003). Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en astrocitos se pueden mantener aun cuando los receptores NMDA, AMPA, GABA_B, P2XR y P2YR están bloqueados farmacológicamente, ya que cuentan con otros receptores que producen la movilización de Ca^{2+} en las células, así como los TRPA1 como se describió previamente (Wu *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2019). En la **Figura 7** se observan los mecanismos que producen la movilización del Ca^{2+} en el interior de la célula y los mecanismos que utilizan éstas para transmitir el Ca^{2+} de una célula a otra.

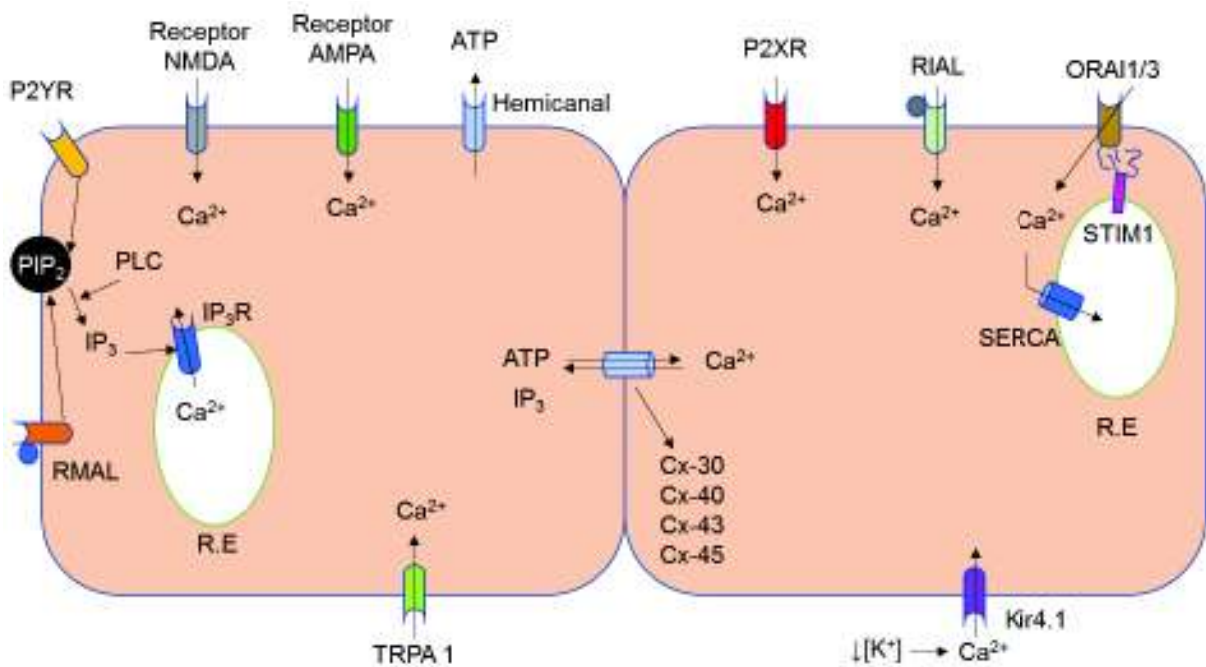


Figura 7. Movimientos intracelulares de Ca^{2+} en células gliales. Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2); Receptor ionotrópico activado por ligando (RIAL); Receptor metabotrópico activado por ligando (RMAL); Fosfolipasa C (PLC).

I.5. Movimientos intracelulares de Ca^{2+} en neuronas

Al igual que las células gliales, las neuronas poseen diversos mecanismos que le permiten generar movimientos intracelulares de Ca^{2+} . Particularmente, éstos pueden producirse por efecto de la comunicación extracelular iniciada por células gliales o neuronas, o bien, por la activación de vías de señalización intracelular (Reyes-Haro *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2020). Publicaciones

recientes muestran que la SERCA es el mecanismo que regula las características de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en las neuronas, funcionando como un regulador del tiempo de crecimiento de las respuestas de Ca^{2+} , mientras que la PMCA, incrementa la amplitud y latencia de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} (Walters *et al.*, 2019). La comunicación glutamatérgica entre las neuronas desempeña un papel fundamental en las redes celulares, ya que se activan receptores de tipo NMDA y AMPA (McDonough *et al.*, 2017).

En neuronas, se ha identificado que los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L, tienen un rol principal en los movimientos intracelulares de Ca^{2+} y que éstos, pueden ser modulados por la activación de canales de Na^+ dependientes de voltaje. Además, estos canales de Ca^{2+} están identificados como uno de los mecanismos principales que utilizan las neuronas para producir movimientos intracelulares de Ca^{2+} (Tang *et al.*, 2003). En células mitrales y células granulares, la activación de canales de tipo TRP produce movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos en las neuronas, estos canales iónicos no específicos están asociados con la activación de receptores de NMDA, funcionando como receptores sensibles al flujo de Ca^{2+} . El TRPM1, TRPC1 y TRPC4 participan en la modulación de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} y la activación de los NMDA para generar un influjo de Ca^{2+} (Stroh *et al.*, 2012; Egger y Stroh, 2009; Shpak *et al.*, 2015). Estos mecanismos son utilizados por las neuronas para realizar procesos de inhibición/excitación lateral con las neuronas que están formando el circuito olfativo, donde principalmente se realizan contactos dendrodendríticos para activar mecanismos de regulación en células granules o de excitación en células mitrales (Ona-Jodar *et al.*, 2020).

I.6. Movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincrónicos

Dentro de la comunicación celular en el SN, los movimientos intracelulares de Ca^{2+} tienen un gran impacto, sobre todo para aquellas células que no poseen las mismas propiedades de excitabilidad eléctrica que las neuronas. En este sentido, se ha observado en diversas publicaciones que los movimientos intracelulares de Ca^{2+} pueden ocurrir de manera sincrónica en corteza, hipocampo y BO. Además, este tipo de actividad de Ca^{2+} sincrónica puede modular la comunicación celular, haciendo que se generen corrientes de excitación o inhibición posináptica y que, se activen cascadas de comunicación intercelular dependientes de Ca^{2+} (Chen

et al., 2009; McDonough *et al.*, 2017). Aún más, existe evidencia que muestra que la sincronización de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} entre dos astrocitos favorece la modulación de los vasos sanguíneos y, por lo tanto, la unión neurovascular (Gu *et al.*, 2018).

Las células del SN están comunicadas entre ellas a través de uniones comunicantes, que utilizan para transmitir moléculas pequeñas como segundos mensajeros (AMPC, Ca^{2+} , IP_3 y ATP). Las uniones comunicantes, están formadas por proteínas de membrana llamadas “conexinas”, en astrocitos se expresan las conexinas Cx30, Cx40, Cx43 y la Cx45 (**Figura 7**). Cuando hay movimientos intracelulares de Ca^{2+} en una neurona o célula glial, éste tiene la capacidad de transmitir el Ca^{2+} a través de las uniones comunicantes. Sin embargo, hay evidencia que muestra que las células gliales forman una estrecha red de comunicación celular entre ellas, capaces de generar puentes de comunicación y de transporte de sustancias a través de las conexinas (Deitmer *et al.*, 1998; Orellana y Stehberg, 2014). En el BO, las NSO se comunican con las células mitrales/penacho dentro del glomérulo olfativo, dentro de esta estructura se realiza el intercambio de información, esto produce que las células del BO generen movimientos intracelulares de Ca^{2+} y particularmente, la sincronización de éstos entre las células mitrales/penacho, quienes pueden sincronizarse en distancias de hasta 200 μm (Chen *et al.*, 2009).

Debido a la importancia que tienen los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en el SN, nos preguntamos si las células del BO generan movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y sincrónicos durante el procesamiento de la información olfativa dentro del BO, ya que el olfato es un sentido muy importante que activa e interviene en la generación de conductas en los animales al estar coordinado con diferentes regiones del cerebro. Actualmente, la investigación en torno al procesamiento de la información olfativa no está comprendida celularmente. Por lo tanto, la información que se genere de este proyecto de investigación contribuirá a comprender si los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en las redes de comunicación celular del BO de la rata se generan espontánea y sincrónicamente durante el procesamiento de los olores.

II. HIPÓTESIS

Las células producen movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y sincrónicos en las redes de comunicación del bulbo olfatorio de la rata.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general

Estudiar los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos, sincrónicos e inducidos en las redes de comunicación celular del bulbo olfatorio de la rata.

III.2. Objetivos particulares

1. Estudiar los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos generados por las células de la capa plexiforme externa e interna y en la capa mitral del bulbo olfatorio de la rata.
2. Identificar la sincronización de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} entre la capa plexiforme externa e interna y en la capa mitral del bulbo olfatorio de la rata.
3. Identificar la vía de señalización y la participación de reservorios intracelulares en los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos de las células de bulbo olfatorio.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto de investigación está aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Sonora con registro oficial CEI-UNISON 012/2020.

Un grupo de 6 ratas Wistar P7-21 fue utilizado para realizar este trabajo de investigación. Los animales se mantuvieron en ciclos de luz-oscuridad de 12 h y tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum*. Los animales se obtuvieron del bioterio del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud, de la Universidad de Sonora. Se trabajó de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999.

IV.1. Disección de bulbo olfatorio

Los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de Pentobarbital sódico (PiSA agropecuaria) 120 mg/1 kg de peso y se practicó la eutanasia. Rápidamente se extrajo el BO con material de disección (1 min/rata), durante toda la extracción el BO se perfundió constantemente con Fluido Cerebroespinal Artificial (aCSF) con alto Mg^{2+} frío (4-10°C) compuesto de (en mM): 125 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 3 KCl, 1.25 $NaHPO_4 \cdot 2H_2O$, 10 $C_6H_{12}O_6$, 6 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 $CaCl_2 \cdot 6H_2O$. Los BOs obtenidos se depositaron en una caja Petri estéril de 35 mm de diámetro con aCSF (alto Mg^{2+}) frío. Con bisturí se realizaron cortes coronales de aproximadamente 500 μm de espesor. Se incubaron en aCSF (alto Mg^{2+}) saturado con carbógeno (95% oxígeno, 5% dióxido de carbono) a 37°C por 45 min.

IV.2. Registro de movimientos intracelulares de Ca^{2+}

Los registros de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} se realizaron en el laboratorio de Fisiología y Farmacología del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora (edificio 7D). Las rebanadas de BO se incubaron por 30 min en oscuridad con el indicador de Ca^{2+} Fluo 4-AM (15 μM , Sigma-Aldrich) solubilizado en aCSF (alto Mg^{2+}) saturado con carbógeno. Una rebanada de BO se colocó sobre la cámara de perfusión sujeta a la platina de un microscopio Leica DM500 (Leica Microsystems, EUA), durante todo

el experimento la rebanada se perfundió con aCSF (4 mL/min) compuesto de (en mM): 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 3 KCl, 1.25 NaHPO₄-2H₂O, 10 C₆H₁₂O₆, 1 MgCl₂-6H₂O, 2 CaCl₂-6H₂O a 37°C (Zeiter, 2017). Las células del BO se observaron con un objetivo de inmersión en agua 20x/0.8 NA (Leica Microsystems, Alemania). El Fluo 4-AM se excitó a 490 nm con un sistema de iluminación LED X-cite XYLIS™ (Excelitas technologies, EUA). La emisión a 510 nm se colectó utilizando un espejo dichroico con una frecuencia de muestreo de 1 imagen por segundo y una resolución de 512 x 512 píxeles por campo, utilizando la cámara CCD Electro-retiga (Teledyne Photometrics, EUA). La intensidad del sistema de iluminación LED se mantuvo al 5% para evitar daños a las muestras. Los resultados se analizaron y se ilustraron con el programa de imágenes PVCAM (Teledyne Photometrics, EUA), programa de libre acceso Fiji imageJ (NIH, EUA) y el programa Microcal OriginPro versión 9.65 (Corporación OriginLab, EUA). En los experimentos de movimientos intracelulares de Ca²⁺ inducidos, primero se registraron 2 min de actividad basal de las células de BO seguido de la perfusión por 10 s con 1 μM ácido acético (A6283; Sigma-Aldrich, EUA), 1 mM ATP (A26209; Sigma-Aldrich, EUA), 20 mM K⁺ extracelular y 1 mM D-serina (S4250; Sigma-Aldrich, China) solubilizados en aCSF, después se registró la actividad basal por 4 min. Una vez que se identificó el efecto de cada agonista (ácido acético, ATP, alto K⁺ y D-serina), la rebanada de BO se incubó por 3 min con 20 μM ácido ciclopiazónico (CPA; inhibidor reversible de la bomba Ca²⁺-ATPasa del retículo endoplásmico; C1530, Sigma-Aldrich, EUA) y con 2-aminoetil difenilborato (2-APB; inhibidor de receptores IP₃; D9754, Sigma-Aldrich, Alemania), ambos fármacos diluidos en aCSF. En los experimentos realizados en condiciones de 0 Ca²⁺ extracelular (0-Ca²⁺_E; el Ca²⁺ fue sustituido con 3 mM de MgCl₂) se agregó 1 mM de ácido etilenglicol-bis(2-amino-etil-éter)-N, N, N', N'-tetraacético (EGTA; E4378; Sigma-Aldrich, EUA) para observar la influencia que tiene el Ca²⁺_E sobre los movimientos intracelulares de Ca²⁺ espontáneos. Los resultados se presentan como porcentaje de fluorescencia (%ΔF, unidades arbitrarias, UA) y se reportaron como media ± error estándar de n ≥ 50 células, a menos que se indique lo contrario. Se utilizó un criterio de inclusión/exclusión para todos los movimientos intracelulares de Ca²⁺ generados por las células. Se promediaron las primeras 20 imágenes capturadas de cada célula y se calculó el ES para cada una, los movimientos intracelulares de Ca²⁺ que cumplieron con este criterio se tomaron como n.

IV.3. Análisis de los movimientos intracelulares de Ca²⁺ sincrónicos

Se utilizó el protocolo de análisis descrito por Müller *et al.* (2009) y Reyes-Haro *et al.* (2010) para estudiar los movimientos intracelulares de Ca²⁺ sincrónicos en células de BO de rata. Primero, se utilizaron criterios inclusión/exclusión para la identificación de los movimientos intracelulares de Ca²⁺ sincrónicos. Todos aquellos eventos que tuvieran su pico máximo en un rango de ± 2 s de diferencia con el pico máximo de los movimientos intracelulares de Ca²⁺ más cercanos, se consideraron como un evento sincrónico. Debido a que los experimentos de movimientos intracelulares de Ca²⁺ sincrónicos se realizaron con el mismo rango de tiempo (600 s), se calculó la probabilidad de que ocurra un evento sincrónico entre las células del BO (en presencia y ausencia de Ca²⁺_E) en función de la siguiente expresión matemática:

$$P_S = \binom{n}{x} p_{SE}^x (1 - p_{SE})^{n-x}$$

Donde:

P_S es la probabilidad de observar movimientos intracelulares de Ca²⁺ sincrónicos en rebanadas de BO.

n es el número total de experimentos

x es el número de experimentos con eventos sincrónicos

P_{SE} es la probabilidad experimental de observar movimientos intracelulares de Ca²⁺ sincrónicos.

1 - P_{SE} es la probabilidad experimental de no observar movimientos intracelulares de Ca²⁺ sincrónicos.

IV.4. Inmunohistoquímica

Una vez realizados los registros de movimientos intracelulares de Ca²⁺, las rebanadas de BO se reposaron 4 h en formaldehído (47608; Sigma-Aldrich, Suiza) al 4% (v/v). Los cortes de BO (500 μ m) se incubaron en solución bloqueadora (aCSF + 10% suero fetal bovino, SFB), en atmósfera húmeda y en agitación durante 1 h. El tejido se lavó con aCSF y se agregó el anticuerpo primario anti-Proteína Acídico Glío-Fibrilar (anti-GFAP; G9269; Sigma-Aldrich, EUA) diluido (1:200) en solución bloqueadora, se incubó 24 h en agitación. Después se lavó tres veces con solución bloqueadora y se les agregó el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo

conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Anti-IgG-FITC; F0382; Sigma Aldrich, EUA) diluido (1:300) en solución bloqueadora, incubándose por 8 h en oscuridad (Montiel-Herrera *et al.*, 2006). Finalmente se realizaron tres lavados con aCSF y se analizaron con un microscopio de epifluorescencia (Leica DM500).

IV.5. Impregnación Golgi-Cox rápida

Las rebanadas de BO se mantuvieron sumergidas en solución Golgi-Cox compuesta de: $K_2Cr_2O_7$ (P5271; Sigma-Aldrich, India), $HgCl_2$ (M1136; Sigma-Aldrich, India) y K_2CrO_4 (216615; Honeywell Fluka, EUA), en completa oscuridad durante 7 días. Se realizaron lavados con agua destilada a cada BO y se almacenaron dentro de solución protectora de tejido compuesta de: NaCl (793566; Sigma-Aldrich, EUA), sucrosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$; S9378; Sigma-Aldrich, EUA), polivinilpirrolidona (PVP40; Sigma-Aldrich, China), etilenglicol ($C_2H_6O_2$; 324558; Sigma-Aldrich, EUA), en oscuridad a 4°C durante 7 días (Zaqout y Kaindl, 2016). Posteriormente, se lavaron con agua destilada.

IV.6. Procesamiento de tejido para histología

Las rebanadas de BO se sometieron a un tren de deshidratación con etanol 70%, 80%, 96% y etanol absoluto 1 h en cada uno (Ahmed, 2016). Se dejaron reposar 2 h en xileno (2389; FAGA Lab, México), se incubaron 6 h en parafina líquida a 60 °C (2296; FAGA Lab, Mexico), se incluyeron en moldes con parafina (Histocore Arcadia H y C, Leica Microsystems, EUA) y, ya solidificados, se realizaron cortes de 50 μm de espesor en un microtomo MICROM HM 355S (Thermo Fisher SCIENTIFIC, EUA).

IV.7. Tinción hematoxilina-eosina

Una vez realizados los cortes histológicos, se trató el tejido para eliminar el exceso de parafina con: Xileno (20 s), una mezcla de etanol/xileno (20 s), etanol absoluto (20 s), etanol al 96% (20 s). Se lavó con agua destilada y se dejó reposar en hematoxilina de Gill (30 s; H3136; Sigma-Aldrich, EUA), se lavó con agua destilada y se dejó reposar en solución de Scott (hasta que el

tejido presentara un viraje de color; 166.15 mM MgSO₄ y 23.8 mM NaHCO₃), se lavó con agua destilada. El tejido se deshidrató con: solución 1:1 de eosina (10 s; 318906; Sigma-Aldrich, EUA) / floxina B (P4030; Sigma-Aldrich, Japón), etanol al 96%, etanol absoluto, mezcla de etanol/xileno y xileno (20 s cada uno). Finalmente se lavó con agua destilada.

IV.8. Análisis de datos

Todos los datos obtenidos de los registros de movimientos intracelulares de Ca²⁺, se presentan como media ± error estándar de $n \geq 50$, a menos que se indique lo contrario. El análisis estadístico para los resultados de movimientos intracelulares de Ca²⁺ espontáneos y movimientos intracelulares de Ca²⁺ sincrónicos se realizó mediante la prueba “t de student” para comparar las medias de dos grupos (en presencia y ausencia de Ca²⁺) con un nivel de confianza de $p \leq 0.05$. Los datos de movimientos intracelulares de Ca²⁺ inducidos por agonistas se analizaron mediante la prueba de Friedman con un nivel de confianza de $p \leq 0.05$. Las diferencias significativas entre los movimientos intracelulares de Ca²⁺ inducidos por agonistas se analizaron con la prueba de Bonferroni para identificar entre cuales agonistas había diferencias significativas con un nivel de confianza de $p \leq 0.05$. Los datos de las técnicas histológicas (inmunohistoquímica, impregnación Golgi-Cox rápida y tinción hematoxilina-eosina) se reportan como media ± error estándar de al menos 3 réplicas. Para los datos obtenidos de la inmunohistoquímica, se realizó una correlación de Pearson para identificar si la cantidad de células GFAP positivas estaba relacionada con la cantidad de células que generaron movimientos intracelulares de Ca²⁺ espontáneos, con un nivel de significancia $p \leq 0.05$.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

V.1. Movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos

Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos (**Figura 8**) generados por las células del BO de rata (P7-21) se registraron en presencia (2 mM) o ausencia de Ca^{2+}_E . En la **Figura 8A** se muestran dichos movimientos de Ca^{2+} registrados entre las capas celulares CPE, CP y CPI del BO.

Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} se han identificado en preparaciones de corteza, hipocampo y retina. Sin embargo, poco se han estudiado en preparaciones de BO, por lo que se procedió a identificar si los movimientos intracelulares de Ca^{2+} se presentaban en las células del BO, utilizando aCSF fisiológico (2 mM). Particularmente, las neuronas y células gliales presentan diferencias en la frecuencia de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} . Por ello, se esperaba encontrar frecuencias similares a las reportadas en diferentes regiones del cerebro, incluyendo el BO, en este último dichas frecuencias de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} se generan frecuencias máximas de hasta 4000 mHz (neuronas) y 300 mHz (glía), frecuencias mínimas de 4-10 mHz en ausencia de un estímulo olfativo (Droste *et al.*, 2017; Stavermann *et al.*, 2015; Maslyukov *et al.*, 2018).

Nuestros resultados mostraron que, de un total de 456 células de BO, el 70% ($n = 319$) de las células no generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos. De 91 ± 23 ($n = 456$) células por experimento, solamente 12 ± 3 ($n = 59$) células del BO generaron 1.13 ± 0.38 movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos de 3.75 ± 1.28 mHz. Comparando el total de células que generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos ($n = 59$) y el total de células analizadas ($n = 456$), la relación del 13% de respuesta se mantuvo constante. De las 59 células, el 90% de las células produjo un único movimiento intracelular de Ca^{2+} espontáneo durante los 10 min de registro (**Figura 8B**), el 8.5% generó dos eventos (**Figura 8C**) y solamente el 1.7% generó tres eventos (**Figura 8D**) durante los 10 min de registro. La distribución de las células que generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos ocurrió principalmente en la CPI, donde 25 de las 59 células que generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos se encontraban distribuidas en esta capa. Finalmente, se observó que 20 y 14 ($n =$

59) células que generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} se encontraron en las capas CM y CPE, respectivamente.

Para analizar si dichos movimientos de Ca^{2+} generados por las células del BO eran generados por efecto del $\text{Ca}^{2+}_{\text{E}}$, por ejemplo, a través de canales iónicos, el Ca^{2+} de la solución de perfusión se sustituyó con 3 mM de MgCl_2 . De este modo, se esperaba que los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos disminuyan en número, pero sin dejar de producirse, ya que las células deberían de activar mecanismos intracelulares para la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares, particularmente del retículo endoplásmico. El análisis de los resultados en ausencia de $\text{Ca}^{2+}_{\text{E}}$, mostró que los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos eran generados por el 4% ($n = 5/132$) de las células del BO con una frecuencia de 1.21 ± 0.44 mHz. Las 5 células generaron un único evento durante los 10 min de registro (**Figura 8E**). Asimismo, se observó que estos movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos generados por las células del BO en las condiciones previamente descritas, no siguió un patrón anatómico funcional (CPE-CM-CPI). Es decir, dichos movimientos intracelulares de Ca^{2+} no siguieron una dirección desde la capa plexiforme externa hacia la capa plexiforme interna (visto anatómicamente desde el eje rostro-caudal). El análisis estadístico reveló que hay diferencias significativas ($p = 0.02$) entre la cantidad de células que generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos con (2 mM) y sin $\text{Ca}^{2+}_{\text{E}}$.

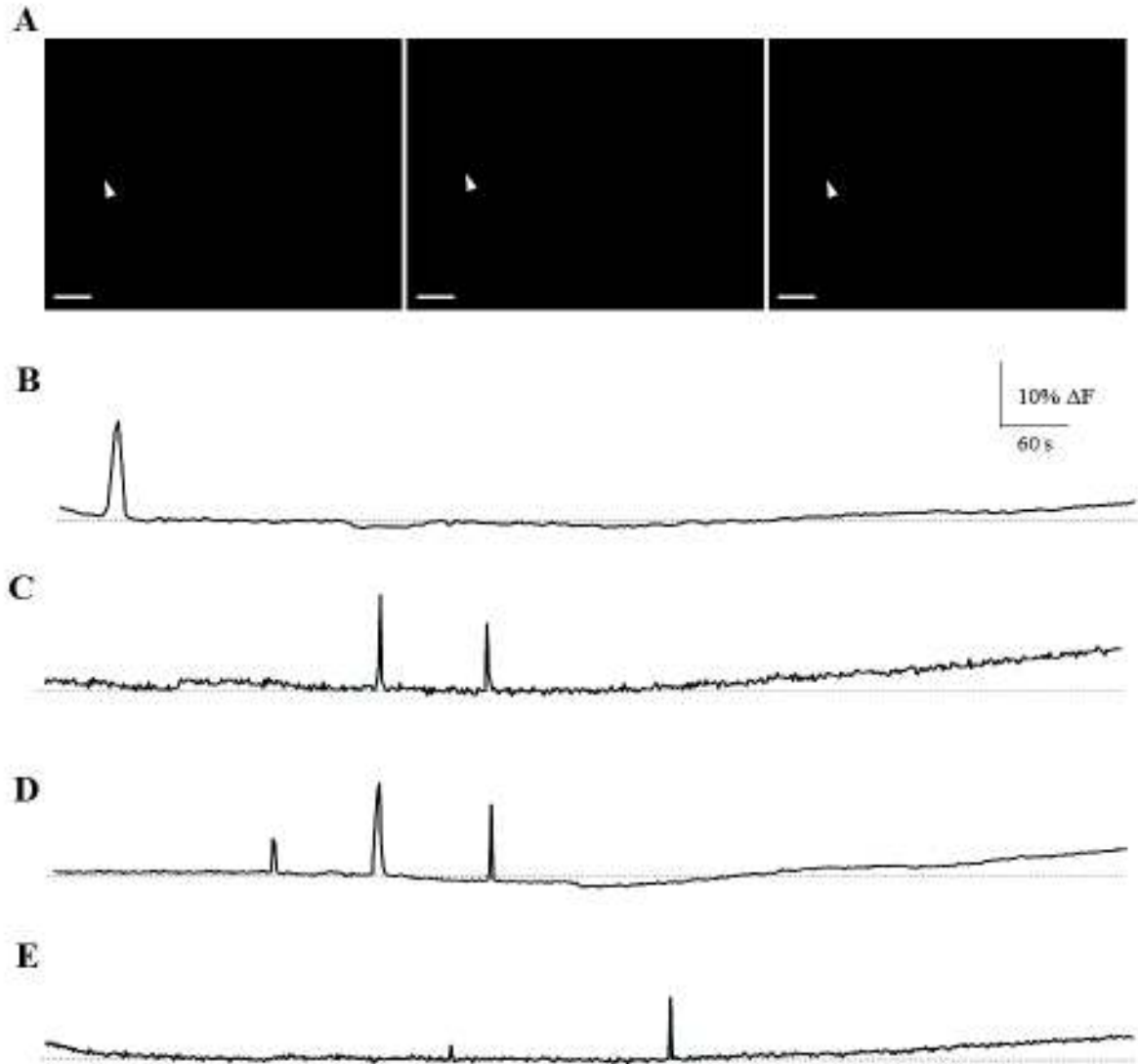


Figura 8. Movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos en células de BO. En **A**, se muestra una célula representativa que generó un movimiento intracelular de Ca^{2+} espontáneo (5 rebanadas/3 ratas; P10, P16 y P20). En **B**, se muestra un experimento representativo donde la célula analizada generó un solo movimiento intracelular de Ca^{2+} espontáneo mientras era perfundida con una concentración fisiológica de $\text{Ca}^{2+}_{\text{E}}$. En **C**, se muestra un experimento representativo de una célula que generó dos movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos. En **D**, se muestra un experimento representativo de una célula que generó tres movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos. En **E**, se muestra un experimento representativo de una célula que generó un movimiento intracelular de Ca^{2+} espontáneo en condiciones de 0 $\text{Ca}^{2+}_{\text{E}}$ con EGTA (1 mM; 3 rebanadas/2 ratas; P8 y P21). Barra de calibración = 20 μm .

Las células localizadas entre las capas CPE, CM y CPI del BO, mostraron diferentes tipos de movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos. Utilizando una concentración de 2 mM de Ca^{2+}_E , las células generaron dichos movimientos de Ca^{2+} en diferentes intensidades relativas de fluorescencia. De las 59 células que generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos, la distribución en la intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, u.a.) se observó de la siguiente manera: 8 células con $\Delta F = 20\%$; 8 células con $\Delta F = 15\%$; 16 células con $\Delta F = 10\%$; 7 células con $\Delta F = 7\%$; 9 células con $\Delta F = 5\%$, 6 células con $\Delta F = 4\%$ y 5 células con $\Delta F = 1\%$. De este modo, los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos se analizaron para observar su comportamiento con respecto al tiempo y se observó que las células del BO presentaron crecimiento exponencial con $\tau 2.3 \pm 0.9$ s y decaimiento exponencial con $\tau 1.4 \pm 0.6$ s.

En los experimentos con 0 Ca^{2+}_E , las células generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos ($n = 5$) en dos intensidades relativas de fluorescencia (u.a.). Tres de estas células generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos con $\Delta F = 10\%$, mientras que las 2 células restantes con $\Delta F = 4\%$. Sin embargo, a pesar de presentar dos intensidades de fluorescencia diferentes, dichos movimientos de Ca^{2+} mantuvieron un crecimiento exponencial de $\tau 1.2 \pm 0.3$ s y decaimiento exponencial similar con $\tau 0.8 \pm 0.2$ s ($n=5$).

Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos con 2 mM de Ca^{2+}_E resultaron de mayor latencia en comparación con aquellos generados en ausencia de Ca^{2+}_E , con una latencia promedio de 25.2 ± 2.3 s ($n = 59$) y 5 ± 2 s ($n = 5$) respectivamente. El análisis estadístico reveló que existen diferencias significativas entre la latencia de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en presencia y ausencia de Ca^{2+}_E ($p = 0.0058$). En la **Figura 9** se muestra un histograma que ilustra latencia, crecimiento y decaimiento exponencial de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos de las células del BO en presencia y ausencia de Ca^{2+}_E . En este sentido, se observó que las células que generaron un movimiento intracelular de Ca^{2+} espontáneo, presentaron un comportamiento similar con respecto a la intensidad de fluorescencia ($\% \Delta F$), los tiempos de crecimiento, decaimiento y latencia y, por lo tanto, se consideraron como iguales. Las células que generaban dos y tres movimientos intracelulares de Ca^{2+} mostraron que éstos se generaban con una menor latencia que cuando se generaba un solo movimiento intracelular de Ca^{2+} , esto mismo sucedió con las 5 células que generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos en ausencia de Ca^{2+}_E . En este sentido, se observó que las células que generaron dos

y tres eventos durante los registros son similares a los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos generados por aquellas células a las que se les removió el Ca^{2+}_E . De acuerdo con esta información, se sugiere que la producción de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos no es dependiente de la presencia del Ca^{2+}_E , pero la duración de éstos sí lo es.

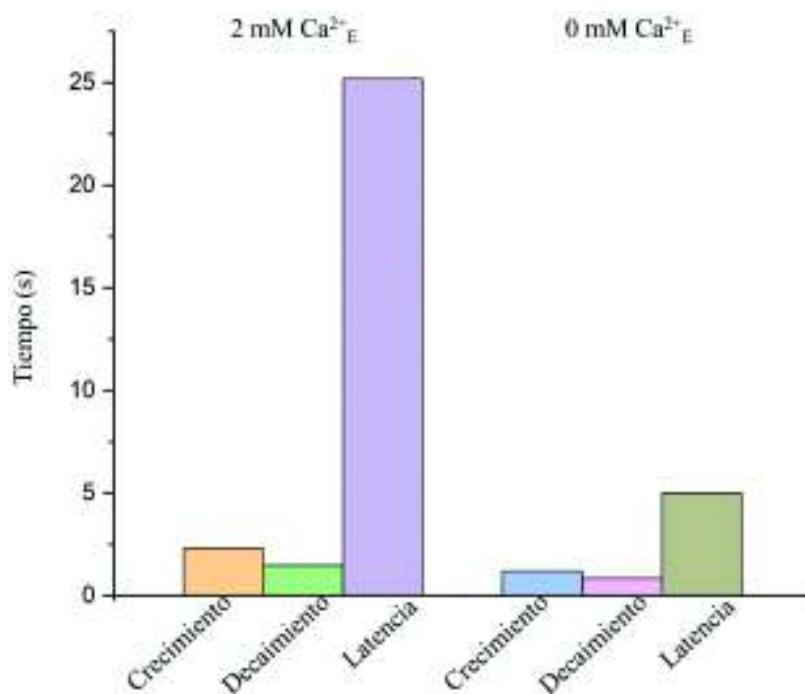


Figura 9. Histograma comparativo de latencia, crecimiento y decaimiento exponencial de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos de las células de BO, en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular. Diferencias significativas de latencia entre los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos en presencia y ausencia de Ca^{2+}_E , $p = 0.0058$.

Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos generados por las células del BO en ausencia de Ca^{2+}_E , mostraron que las células tienen la capacidad de producir movimientos intracelulares de Ca^{2+} por vías intracelulares independientes del Ca^{2+}_E . En el BO, las células tienen la capacidad de generar dichos movimientos de Ca^{2+} por diversos mecanismos y éstos pueden ser generados sin la contribución neuronal como se ha mostrado en experimentos *in vitro* realizados por el equipo de investigación de Rui *et al* (2020), donde han mostrado que la glía tiene la capacidad de generar movimientos intracelulares de Ca^{2+} en cultivo, indicando que la glía tiene sus propios mecanismos para movilizar el Ca^{2+} . Uno de los mecanismos utilizados

por las células para generar movimientos intracelulares de Ca^{2+} es la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares, la liberación de Ca^{2+} se puede producir en respuesta a incrementos de la concentración citosólica de Ca^{2+} generados por la misma actividad intracelular. Por ejemplo, aquella producida por la bomba SERCA y la activación de receptores de IP_3 (Kovacs *et al.*, 2005; Kraft, 2015; Rui *et al.*, 2020). Lo anterior, sugiere que las células gliales mantienen comunicación activa con las neuronas y que, esta comunicación no es necesaria para que la glía genere movimientos intracelulares de Ca^{2+} , ya que la glía tiene sus propios mecanismos intracelulares para movilizar el Ca^{2+} . Más aún, las células gliales expresan diversos tipos de conexinas que utilizan para formar una red de comunicación con las demás células del BO y éstas tienen la capacidad de transmitir moléculas como segundos mensajeros (ATP , IP_3 y Ca^{2+}) que activan receptores intracelulares, produciendo que se libere Ca^{2+} del RE y, de este modo, es posible que los movimientos intracelulares de Ca^{2+} generados por las células del BO en ausencia de Ca^{2+}_E utilicen este mecanismo de conectividad/comunicación intercelular que permite la transmisión de moléculas pequeñas para mover Ca^{2+} de una célula a otra (Deitmer *et al.*, 1998; Orellana y Stehberg, 2014; Stavermann *et al.*, 2015).

Las células del BO presentan una menor frecuencia en la actividad espontánea con respecto a otras regiones del cerebro, donde las neuronas corticales pueden alcanzar frecuencias de hasta 4000 mHz (Maslyukov *et al.*, 2018). Está documentado en regiones corticales en estudios *in vitro* que la glía presenta actividad en frecuencias de 120 mHz en el soma, mientras que en los procesos celulares los movimientos intracelulares de Ca^{2+} pueden variar dependiendo del diámetro de estos y de la concentración extracelular de Ca^{2+} (Wu *et al.*, 2019).

Las células del BO pueden generar movimientos intracelulares de Ca^{2+} con un amplio rango de frecuencia (5-4000 mHz). Sin embargo, Shusterman *et al* (2011) mostraron que las interneuronas del BO generan actividad eléctrica de 3-100 Hz cuando se realiza la decodificación de los olores, esto produce que se activen mecanismos para modular la comunicación neuronal a través de neuromoduladores (GABA), receptores NMDA y receptores de glutamato (Linster y Cleland, 2010; Foncelle *et al.*, 2018). Este proceso se genera principalmente por la proteína calcio calmodulina quinasa II (CaMKII), la cual es una enzima que interviene en los procesos de expresión génica donde, a través de la activación de cascadas de fosforilación de factores transcripcionales como el elemento de respuesta a AMPc (CREB,

por sus siglas en inglés) que genera la expresión de genes que pueden inducir la división celular o la liberación de neurotransmisores (Shioda y Fukunaga, 2017). En este sentido, una compleja cadena de activación se conforma por la activación de los receptores NMDA y receptores de diferentes agonistas, produciendo la entrada de Ca^{2+} hacia el interior de las células y consecuentemente, la activación de la CaMKII que funciona como una enzima moduladora de la señalización intracelular. De este modo, los movimientos intracelulares de Ca^{2+} funcionan como mecanismos de regulación en el circuito olfativo. Aún más, actualmente existe información que sugiere que, en estados de anestesia, los movimientos intracelulares de Ca^{2+} de las células del SNC se ven afectados, pudiendo generar oscilaciones de Ca^{2+} o manteniendo al sistema en estado de inactividad (Evans *et al.*, 2013).

Las células que expresan receptores para GABA se encuentran distribuidas en todas las capas del BO, esto gracias a la múltiple distribución de células en las diferentes capas. Principalmente las células que expresan receptores y transportadores funcionales para GABA son células periglomerulares, células superficiales de axón corto (capa glomerular), células en penacho de la CPE, células grandes de axón corto (capa glomerular), células granulares y células mitrales (Panzanelli *et al.*, 2005; Vaaga *et al.*, 2017). Mientras que, para glutamato se expresan receptores y transportadores funcionales en células en penacho, células mitrales, células de axón corto (Tatti *et al.*, 2014; Nagayama, 2014). Sin embargo, está evidenciado que las células gliales, en particular los astrocitos, presentan estos tipos de mecanismos que utilizan para reconocer y transportar GABA y glutamato. En este sentido, estas células son capaces de producir movimientos intracelulares de Ca^{2+} en respuesta a glutamato, debido a que los receptores de este agonista introducen Ca^{2+} hacia el citoplasma celular (NMDA y AMPA) o activan receptores de IP_3 produciendo la liberación de Ca^{2+} , mientras que GABA modula estas corrientes de Ca^{2+} activando canales de cloruro ($\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$), inhibiendo la actividad de la adenilato ciclasa y canales de Ca^{2+} ($\text{GABA}_{\text{B}}\text{R}$), asimismo activando canales de rectificación interna de K^+ de tipo Kir3 (Bettler *et al.*, 2004; Mahmoud *et al.*, 2019; Mederos y Perea, 2019; Mahan, 2019).

En nuestro modelo de experimentación, la baja frecuencia de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} podría asociarse por la falta de activación proveniente de las NSO y probablemente los movimientos intracelulares de Ca^{2+} generados por las células del BO se mantienen en estado de inactividad, manteniendo la retroalimentación de los circuitos celulares,

ya que, al ser una estructura sensorial, la activación de las células del BO depende principalmente de la comunicación con las NSO (Boyd *et al.*, 2012). Sin embargo, los movimientos intracelulares de Ca^{2+} se pueden generar en diferentes frecuencias por diversos estímulos externos que activan receptores de membrana, activación de cascadas de señalización intracelular y posteriormente, la expresión de genes por factores de transcripción dependientes de Ca^{2+} (Bloodgood *et al.*, 2009; Van Den Pol *et al.*, 1996). Esto nos indica que probablemente la mayor fuente de estimulación que recibe el BO es proveniente del epitelio olfativo, pero dentro del BO hay mecanismos que utilizan las células para generar movimientos intracelulares de Ca^{2+} para realizar diversos procesos celulares (como los que ya se mencionaron) esto podría provocar que las células mantuvieran estados de activación prolongados o en estados de inactivación. En este sentido, la vía rostral migratoria del BO desempeña un papel importante, ya que cada día en el cerebro de las ratas se produce un estimado de 10,000 células que utilizan para reemplazar a las células granulares del BO que fueron separadas del circuito celular por mecanismos de muerte celular programada (Petreanu y Alvarez, 2002). Las nuevas células que viajan por la vía rostral migratoria del BO necesitan madurar e integrarse al circuito celular, este proceso es favorecido por la internalización de Ca^{2+} por la activación de receptores AMPA, NMDA, mecanismos como SOCE y TRPC1.

Los aumentos en la concentración del Ca^{2+}_i ayudan a que la CaMKII se active para modular las variaciones de Ca^{2+} , produciendo que se expresen genes que favorecen el crecimiento axonal y dendrítico (Smad4, factor neurotrófico derivado del cerebro) y con ello, que se produzcan proteínas como factores de crecimiento y factores neurotróficos para que las células maduren (Domenichini *et al.*, 2018; Fomin-Thunemann *et al.*, 2020; Naik *et al.*, 2020). Sin embargo, procesos asociados a frecuencias mayores a 100 mHz no se pudieron asociar con nuestros resultados debido a la baja frecuencia de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos generados por las células del BO.

Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} ya se han estudiado en diferentes modelos experimentales. En la rana *Xenopus*, las neuronas de la médula espinal pueden generar estados con movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos de doble exponencial, es decir, presentan un incremento y un decaimiento lento, pero los movimientos intracelulares de Ca^{2+} se ven afectados con la presencia de olas de Ca^{2+} (Gu *et al.*, 1994). Mientras que en células de músculo

liso de ratón, se encuentran dos comportamientos temporales, donde se presentan decaimiento exponencial lento y rápido, en los que participa activamente el RE a través de SERCA que posee influencia sobre las características temporales de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} (Capote *et al.*, 2005). En células de hipocampo CA1, los estados de activación e inactivación que ayudan a generar el crecimiento y decaimiento exponencial en las respuestas de Ca^{2+} dependen principalmente de la despolarización de las células, funcionando como una función inversa ya que, al aumentar la despolarización de las células, el decaimiento exponencial disminuye y viceversa (Ribeiro y Costa, 2000). Esta información podría sugerir que los movimientos intracelulares de Ca^{2+} están asociados a diferentes procesos celulares que pueden favorecer el desarrollo neuronal o la comunicación sináptica en el circuito celular del BO. Sin embargo, las características temporales observadas en los movimientos de Ca^{2+} registrados indican que dichos movimientos son generados por un solo tipo de mecanismo, el cual debería ser estudiado para identificar la fuente de origen de este tipo de señales producidas por las células del BO.

V.2. Movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincronizados

Una vez analizados los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos en células del BO y bajo las mismas condiciones utilizadas en el apartado anterior (en presencia y ausencia de Ca^{2+}_E), se estudió si dichos movimientos de Ca^{2+} se sincronizaban temporalmente entre las células y si éstos eran dependientes de la distancia a la que se encontraban las células. De acuerdo con la literatura, la sincronización de los movimientos de Ca^{2+} puede ocurrir en ausencia de estímulo presentándose con frecuencia de 20-60 mHz, o bien, en presencia de un estímulo olfativo, lo cual genera sincronización de alta frecuencia alcanzando rangos de 2-100 Hz (Inoue y Strowbridge, 2008; Djuricic *et al.*, 2008). Por ello, al realizar el análisis de sincronización se esperaba que las células del BO presentaran una mayor sincronización a la encontrada en nuestro modelo de experimentación. Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincrónicos se muestran en la **Figura 10A**. El 47% ($n = 28/59$) de las células analizadas generó un único movimiento intracelular de Ca^{2+} sincrónicos de 1 ± 0.02 mHz durante 10 min de registro (**Figura 10B**). La sincronización temporal de los movimientos de Ca^{2+} siguió la siguiente distribución: el 54% (n

= 15) de las células se sincronizó entre la CM-CPI, el 32% (n = 9) de las células se sincronizó en CM-CPE y el 14% (n = 4) de las células se sincronizó entre la CPI-CPE.

Para analizar si la sincronización temporal de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos se veían afectados por la ausencia de Ca^{2+}_E , éste se removió del aCSF (se substituyó con 3 mM de MgCl_2). El 72% (n = 15/22) de las células del BO generaron una sola sincronización temporal de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} con una frecuencia de 1.31 ± 0.60 mHz durante 10 min de registro (**Figura 10C**). Finalmente, se identificó entre cuales capas celulares del BO se realizó la sincronización de las células y se observó que, el 60 % (n = 9) de las células se sincronizó entre la CM-CPI, el 35% (n = 5) de las células se sincronizó entre la CM-CPE y el 5% (n = 1) de las células se sincronizó entre la CPI-CPE. La sincronización temporal de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos fue producida por células encontradas a una distancia de 67 ± 45 μm (n = 28) entre las células. El análisis estadístico mostró que hay diferencias significativas (p = 0.003) entre la cantidad de movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincrónicos en presencia y en ausencia de Ca^{2+}_E .

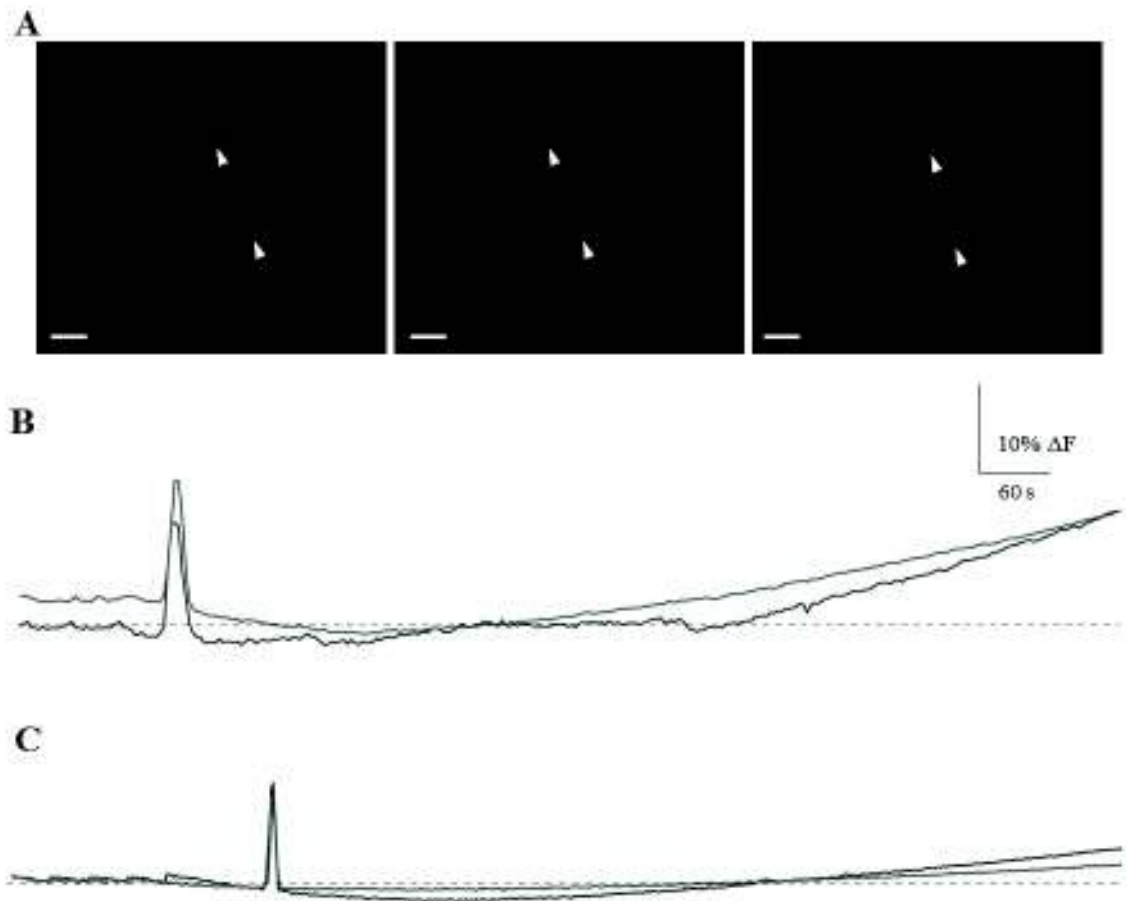


Figura 10. Movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincrónicos en células de BO. En **A**, se muestran dos células representativas que generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincrónicos. En **B**, se muestra un experimento representativo de dos células que sincronizaron temporalmente el movimiento intracelular de Ca^{2+} generado, mientras se perfundía a las células con una concentración fisiológica de Ca^{2+} (5 rebanadas/3 ratas; P10, P16 y P20). En **C**, se muestra un experimento representativo de dos células que sincronizaron temporalmente el movimiento intracelular de Ca^{2+} en condiciones de $0 \text{ Ca}^{2+}_{\text{E}} + \text{EGTA}$ (3 rebanadas/2 ratas; P10 y P20). Barra de calibración = $20 \mu\text{m}$.

Para observar el curso temporal de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} que se sincronizaron entre las células del BO e identificar el número de eventos sincrónicos (datos presentados al inicio de esta sección) se realizó un *raster plot*. En la **Figura 11** se muestran gráficas de distribución de los eventos sincrónicos con respecto al tiempo de registro (600 s) en presencia (**Figura 11A**) y ausencia de Ca^{2+}_E (**Figura 11B**).

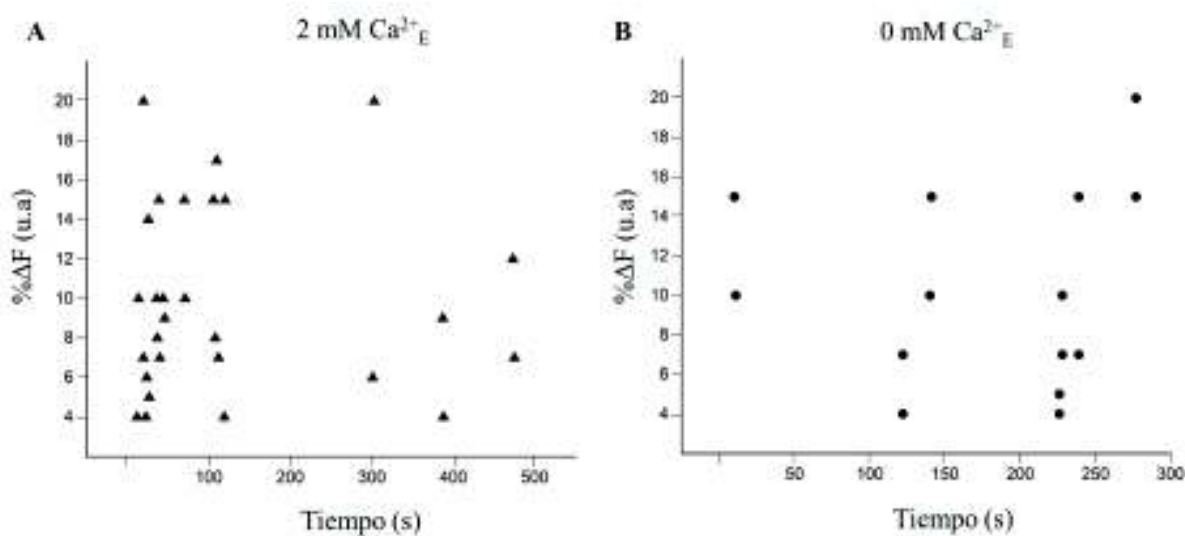


Figura 11. Distribución de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincrónicos en células de BO en función de la amplitud contra el tiempo. En **A**, se muestra un gráfico de distribución de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincrónicos en presencia de 2 mM de Ca^{2+}_E , de $n = 28$ eventos sincrónicos. En **B**, se muestra un gráfico de distribución de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+}_E , de $n = 15$ eventos sincrónicos. En ambas condiciones, todas las células solamente generaron un único evento sincrónico durante los 600 s de registro.

Durante el análisis de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincrónicos, se observó que en presencia y ausencia de Ca^{2+} había rebanadas de BO en los que no se generaron los eventos sincrónicos. Por ello, se utilizó la expresión matemática propuesta en la sección de “*Análisis de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincrónicos*” para calcular la probabilidad de observar eventos sincrónicos en rebanadas de BO. La probabilidad de observar sincronización utilizando 2 mM de $\text{Ca}^{2+}_{\text{E}}$ fue de $P_S = 0.08$, un 8% de probabilidad de observar sincronización en rebanadas de BO. Mientras que, la probabilidad de observar estos eventos sincrónicos en ausencia de $\text{Ca}^{2+}_{\text{E}}$ fue de $P_S = 0.16$, esto quiere decir que hay un 16% de probabilidad de observar sincronización en rebanadas de BO en ausencia de $\text{Ca}^{2+}_{\text{E}}$. Sin embargo, se necesitan realizar más estudios en los cuales el tamaño muestral aumente para que los resultados sean contundentes sobre la probabilidad de observar eventos sincrónicos en células de BO.

La sincronización de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} generada por las células del BO podría deberse a que las células del BO poseen diversos tipos de conexinas que favorecen el transporte de moléculas pequeñas (Ca^{2+}) de una célula a otra. Por ello, en nuestro modelo de experimentación la sincronización de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} se observó aún en condiciones de 0 $\text{Ca}^{2+}_{\text{E}}$ y en presencia de un quelante de Ca^{2+} (para evitar que cualquier remanente de Ca^{2+} que permaneciera libre en el medio extracelular). Bajo estas condiciones, se estudió la influencia del $\text{Ca}^{2+}_{\text{E}}$ sobre la sincronización de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en las células del BO. Debido a que las neuronas y células gliales forman estrechas redes de comunicación en el BO y que utilizan el Ca^{2+} como segundo mensajero para transmitirlo y comunicarse con las células vecinas (Lin *et al.*, 2019). Esto podría sugerir que una fracción de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincronizados, se realiza a través de las conexinas expresadas en células del BO (Beiersdorfer *et al.*, 2019). En el SNC, las conexinas comienzan a expresarse durante etapas embrionarias, ya que ayudan a formar las primeras conexiones entre las células multipotenciales durante el desarrollo del SN. Sin embargo, la cantidad de conexinas expresadas en las células se modifica con respecto a la edad del animal, pero existe evidencia que muestra que en el BO, las conexinas expresadas por las células se mantienen durante la etapa de desarrollo del animal y que, ciertas conexinas pueden estar asociadas a ciertos tipos celulares, como por ejemplo, la conexina 36 (Cx36) y la Cx45 se asocian principalmente a células mitrales, penacho y granulares, la Cx43 se asocia principalmente a astrocitos, la Cx32 a

oligodendrocitos y la Cx30 a microglía (Miragall *et al.*, 1992; Corthell *et al.*, 2012; Swayne y Bennett, 2016; Gajardo-Gómez *et al.*, 2016). De acuerdo con esta información, estas proteínas son de gran importancia para las células desde etapas embrionarias hasta etapas adultas, pero la probabilidad de observar sincronización en las células del BO se incrementa durante procesos de estimulación olfativa por efecto del aumento de la actividad eléctrica durante la decodificación olfativa (Debarbieux *et al.*, 2003; Soucy *et al.*, 2009; Ung *et al.*, 2020).

Existe evidencia que muestra que los movimientos intracelulares de Ca^{2+} dentro del soma celular están asociados con los incrementos en la concentración de Ca^{2+} en las mitocondrias. Debido a que las mitocondrias tienen un rol principal en la bioenergética de las células, su participación como un reservorio intracelular de Ca^{2+} no debería ser subestimada. Esto debido a que las mitocondrias forman conexiones intracelulares con diferentes organelos a través de proteínas con el RE y de este modo, cuando el RE se llena de Ca^{2+} las proteínas de membrana se activan y permiten el transporte de iones de Ca^{2+} hacia las mitocondrias ayudando a la modulación de los patrones temporales de Ca^{2+} producidas por las células. Esto sugiere que las mitocondrias junto con el RE, participa en la regulación de la amplitud y duración de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} citosólicos (Rizzuto *et al.*, 2012; Szymański *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2019). Ambos fenómenos intracelulares (interacción mitocondria-RE) podrían participar en conjunto o independientemente para generar los patrones de comunicación de Ca^{2+} en las células del BO.

De acuerdo con los resultados encontrados en este trabajo de investigación, cuando las células tienen una concentración fisiológica de Ca^{2+} (2 mM) mantienen una sincronización temporal de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en un 47%, mientras que en condiciones de 0 Ca^{2+}_E la sincronización temporal de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} se vio incrementada hasta un 72%. Sin embargo, en cultivos de áreas corticales, Sakaguchi y colaboradores (2019) mostraron que la sincronización se daba solamente en el 14% de las células mientras que, en BO, la sincronización reportada es del 80% y que dicha sincronización se da principalmente entre las interneuronas del BO, particularmente entre células mitrales y células en penacho. Éstas tienen la capacidad de sincronizarse en distancias de 10-184 μm y formar patrones de sincronización entre al menos el 80% de las células mitrales y células en penacho (Chen *et al.*, 2009). Esta información sugiere que tanto las dendritas laterales como la

interacción de las interneuronas del BO mantienen un rol importante en los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en el BO, así como se observó en el análisis de sincronización entre las capas del BO estudiadas. Bajo condiciones de 2 y 0 mM de Ca^{2+}_E , el 60% de las células se sincronizó entre la CM-CPI, esto debido a lo mencionado previamente, la comunicación que mantienen las células mitrales y las células en penacho para favorecer la decodificación de los olores y el procesamiento de la información olfativa. Esta información sugiere que la sincronización de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} observados en este trabajo de investigación, se da principalmente por ensambles neuronales, donde, de acuerdo con Yamashita y colaboradores (2008), la actividad sincrónica se realiza de manera dependiente a la actividad eléctrica de las células y con ello, produciendo que las células como las neuronas logren sincronizar los movimientos intracelulares de Ca^{2+} .

La información presentada en esta sección muestra que ocurren movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincrónicos entre las células del BO. Sin embargo, la posibilidad de que estos eventos se generen por coincidencia y no porque realmente estén formando comunicación sincrónica, no debe descartarse. Por ello, se deberían de realizar más estudios para identificar si las células del BO que conforman una red de comunicación producen movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincrónicos.

V.3. Farmacología de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos

Los resultados mostrados en el apartado de movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos dieron pie para estudiar el mecanismo utilizado por las células del BO para producir dichos movimientos de Ca^{2+} . Por ello, las células del BO se incubaron con 2-APB, el cual es un inhibidor de receptores de IP_3 en el RE, para estudiar si los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos producidos por las células del BO se generaban por la activación de estos receptores. Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} no deberían de dejar de producirse en las células del BO, ya que está evidenciado que éstas activan mecanismos intracelulares que utilizan para mover Ca^{2+} y, además, los receptores de membrana como NMDA y AMPA, introducen Ca^{2+} hacia el citosol por activación glutamatérgica, una de las vías de señalización más importantes para comunicación neuronal y glial. Por esta razón, nosotros esperábamos que los

movimientos intracelulares de Ca^{2+} no se abolieran en presencia de 2-APB. Al incubar el BO con 2-APB, solamente el 10% ($n = 8/82$) de las células del BO generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} de 1.31 ± 0.60 mHz durante 10 min de registro. Sin embargo, los movimientos intracelulares de Ca^{2+} observados en presencia de 2-APB no siguieron las mismas características de latencia, crecimiento y decaimiento exponencial que los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos observados en el apartado “*Movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos*” y por ello, se consideraron como movimientos intracelulares de Ca^{2+} inducidos por el 2-APB (**Figura 12**).

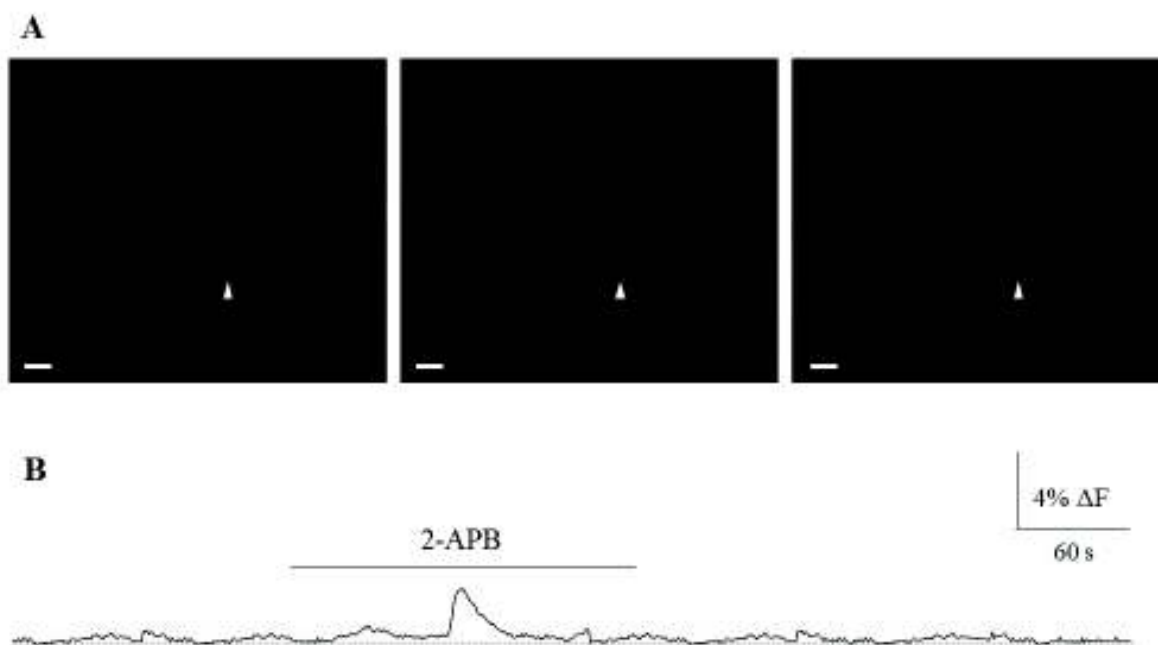


Figura 12. Farmacología de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos en BO P11 (1 rebanada/1 rata). En **A**, se muestra una célula representativa que generó un movimiento intracelular de Ca^{2+} inducido por 2-APB. En **B**, se muestra un experimento representativo donde la célula analizada generó un movimiento intracelular de Ca^{2+} inducido por 2-APB.

Una vez identificado que las células del BO generan movimientos intracelulares de Ca^{2+} inducidos por 2-APB, se observó que estos movimientos intracelulares de Ca^{2+} inducidos eran distintos. Por ello, se realizó el análisis para observar el comportamiento que tenían estos movimientos intracelulares de Ca^{2+} . En la **Figura 13** se observan los diferentes tipos de movimientos intracelulares de Ca^{2+} inducidos por 2-APB generados por las células del BO con

una concentración fisiológica de Ca^{2+} . De las 8 células que generaron dichos movimientos de Ca^{2+} , se encontraron 5 tipos de respuestas diferentes. El 50% ($n = 4$) de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} producidos por las células del BO tuvieron un decaimiento exponencial (**Figura 13A**) con $\tau 16.63 \pm 1.18$ s y una latencia de 71 ± 5 s. Se observó que 1 célula (12.5%) (**Figura 13B**) con un decaimiento exponencial con un valor de $\tau 3.32$ s y latencia de 100 s. De igual manera, 1 (12.5%) célula presentó doble decaimiento rápido (**Figura 13C**) ya que generó dos movimientos intracelulares de Ca^{2+} y ambos, con un valor de $\tau 6.63 \pm 0.41$ s y una latencia de 48 ± 3 s; 1 (12.5%) célula presentó doble decaimiento rápido-lento (**Figura 13D**), el decaimiento rápido con $\tau 4.79$ s con latencia de 30 s y el decaimiento lento con $\tau 30.64$ s y latencia de 165 s. Finalmente, se observó que 1 (12.5%) célula presentó un crecimiento exponencial (**Figura 13E**) con $\tau 55.14$ s y una latencia de 120 s.

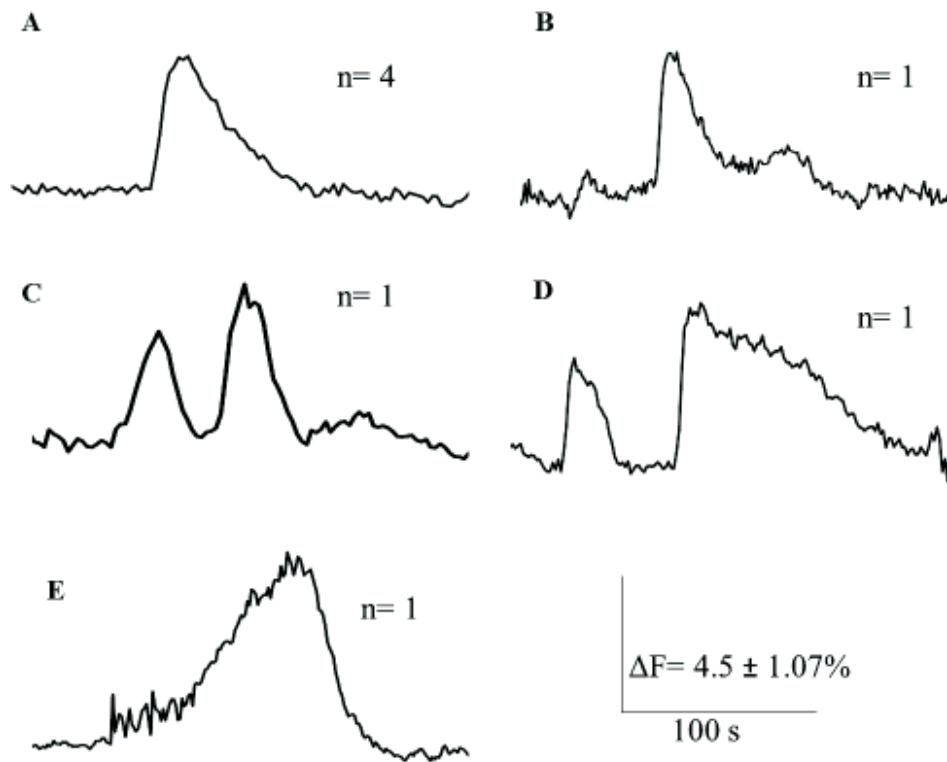


Figura 13. Movimientos intracelulares de Ca^{2+} inducidos por 2-APB en células de BO de rata P11 (1 rebanada/1 rata). En **A**, se muestra una fracción del trazo de una célula que generó un movimiento intracelular de Ca^{2+} con decaimiento exponencial de $\tau 16.63 \pm 1.18$ s y una latencia de 71 ± 5 s. En **B**, se muestra una fracción del trazo de una célula que generó un movimiento intracelular de Ca^{2+} con un decaimiento exponencial de $\tau 3.32$ s y latencia de 100 s. En **C**, se muestra una fracción del trazo de una célula que generó dos movimientos intracelulares de Ca^{2+} con decaimiento exponencial en ambos eventos con un valor de $\tau 6.63 \pm 0.41$ s y una latencia de 48 ± 3 s. En **D**, se muestra una fracción del trazo de una célula que generó dos movimientos intracelulares de Ca^{2+} , el primero con decaimiento exponencial rápido de $\tau 4.79$ s con latencia de 30 s y el segundo con decaimiento exponencial lento de $\tau 30.64$ s y latencia de 165 s. En **E**, se muestra una fracción del trazo de una célula que generó un movimiento intracelular de Ca^{2+} con crecimiento exponencial $\tau 55.14$ s y una latencia de 120 s.

Para identificar si los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos son generados por la actividad de la SERCA, las células del BO se incubaron durante 3 min con CPA para inhibir a esta bomba y producir que el RE libere el Ca^{2+} hacia el citosol. En este sentido, se creía que los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos no serían abolidos ya que al utilizar aCSF con 2 mM de Ca^{2+} , las células deberían de activar canales iónicos de membrana para introducir Ca^{2+} hacia el citosol. En nuestros resultados, se observó que ninguna célula del BO generó movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos durante los 3 min de incubación con el CPA y, asimismo, no se observaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} durante los 10 min de registro. Por esta razón, la falta de movimientos intracelulares de Ca^{2+} no se puede asociar con mecanismos intracelulares (SERCA) debido a la baja frecuencia en la que se generan los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos en las células del BO.

Los resultados encontrados en esta sección dan pie a proponer que los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos generados por las células del BO son activados por el 2-APB, éste al ser un antagonista del IP_3 , bloquea los IP_3R del RE evitando que el Ca^{2+} se libere hacia el citosol. Sin embargo, en bajas concentraciones ($<10 \mu\text{M}$) activa el mecanismo SOCE, generando la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares (Bootman *et al.*, 2002; Peppiatt *et al.*, 2003; Sherwood *et al.*, 2021). Esta información es importante, ya que las células forman conexiones intercelulares a través de uniones comunicantes y con las cuales transmiten moléculas como el IP_3 y el Ca^{2+} (Orellana y Stehberg, 2014). El RE al ser un reservorio intracelular de Ca^{2+} , participa junto con otros mecanismos en la generación de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en las células gracias a que el retículo mantiene una estrecha relación con diferentes organelos formando una red de comunicación intracelular con el núcleo, el aparato de Golgi y las mitocondrias (Szymański *et al.*, 2017; Parry *et al.*, 2006; Vandecaetsbeek *et al.*, 2011). Como se describió previamente, la estrecha comunicación que mantienen las células del BO podría ser subestimada, ya que el Ca^{2+} es transmitido de una célula a otra a través de estas uniones comunicantes, lo que sugiere que la participación de las conexinas en la comunicación celular del BO es importante. Una posible explicación para esto sería que actualmente hay evidencia que sugiere que los movimientos intracelulares de Ca^{2+} generados por astrocitos permanecen cuando los receptores NMDA, AMPA, GABA_B , P2X y P2Y son bloqueados farmacológicamente (Wu *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2019), mostrando que los mecanismos

intracelulares juegan un papel importante para la homeostasis del Ca^{2+} y para la generación de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} .

El CPA, al ser un inhibidor reversible de la SERCA produce el vaciamiento del RE, esto puede activar mecanismos dependientes de STIM1/ORAI1 y de TRP, este fenómeno de movilización de Ca^{2+} se conoce como SOCE (Cheng *et al.*, 2013; Prakriya y Lewis, 2015; Kraft, 2015; Kwon *et al.*, 2017). Sin embargo, en nuestro modelo experimental estos mecanismos no se pueden asociar a la generación de movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos gracias a la baja frecuencia de éstos durante los experimentos. En cultivos corticales de astrocitos, se produjo la inhibición de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos cuando las células se incubaron con un inhibidor de la SERCA (Rodríguez-Prados, 2017; Rodríguez-Prados *et al.*, 2020). Esta información podría indicar que los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos generados por las células del BO son dependientes de reservorios intracelulares de Ca^{2+} como el RE y que la SERCA podría desempeñar un papel más importante en la generación de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos, funcionando como un mediador de estos.

V.4. Movimientos intracelulares de Ca^{2+} inducidos por agonistas

Los resultados descritos previamente dieron pie a estudiar si los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y sincrónicos generados por las células del BO se veían afectados cuando éstas son estimuladas con ATP (1 mM), D-serina (1 mM), K^+ (20 mM) o ácido acético (1 μM), en condiciones fisiológicas de Ca^{2+} (2 mM). Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} generados por las células del BO en respuesta a la aplicación de las sustancias mencionadas se muestra en la **Figura 14**.

Debido a que las células del BO poseen mecanismos a través de los cuales producen movimientos intracelulares de Ca^{2+} , se decidió utilizar diferentes agonistas que ayuden a identificar si dicha actividad de Ca^{2+} se interrumpía por la estimulación con agonistas. Los receptores purinérgicos constituyen una de las principales vías de señalización en el SN. Particularmente, el ATP es una molécula que puede disociarse a ADP y Adenosina, debido a esto, los transmisores purinérgicos derivados del ATP pueden activar una gama de receptores de membrana en las células del BO. Además, el ATP se conoce como un co-transmisor,

liberándose de vesículas sinápticas o viajando a través de uniones comunicantes (panexinas y conexinas). El ATP activa receptores de tipo P2Y y P2X que intervienen en la señalización de Ca^{2+} , introduciendo iones de Ca^{2+} hacia el citosol (P2X) o bien, activando vías de señalización intracelular dependientes de la activación de la PLC y, por lo tanto, la producción de IP_3 generando la liberación de Ca^{2+} del RE (Rotermund *et al.*, 2019). Por ello, se esperaba que más del 50% de las células respondieran a la aplicación de ATP. Se observó que el 50% ($n = 10/20$) de las células del BO generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} que mantuvieron una duración prolongada, en respuesta a la aplicación de 1 mM de ATP (**Figura 14B**).

La D-serina, es una molécula que activa presenta agonismo en los receptores NMDA, estos receptores constituyen una de las principales vías de señalización de Ca^{2+} en neuronas y células gliales, produciendo que aumente la concentración de Ca^{2+} intracelular. Está documentado que la D-serina efectúa la apertura del poro de los receptores NMDA particularmente en células gliales. Por ello, se utilizó D-serina para identificar indirectamente si los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos dependían de la contribución glial, ya que los receptores NMDA pueden estar asociados a procesos de regulación celular y particularmente, las células gliales poseen funciones de regulación neuronal en el SN (Lee *et al.*, 2016; Sandini *et al.*, 2020). En este sentido, se esperaba que entre el 30-50% de las células produjeran respuestas a la estimulación con D-serina. En nuestros experimentos, se observó que el 50% ($n = 18/39$) de las células del BO respondieron con movimientos intracelulares de Ca^{2+} a la aplicación de 1 mM de D-serina (**Figura 14C**).

El mecanismo de la despolarización se ha estudiado ampliamente y está evidenciado que participa en diversos mecanismos que favorecen la comunicación celular. Los incrementos en la concentración de K^+ extracelular produce que las células activen canales iónicos no específicos y que se produzca la internalización no solo de K^+ , sino también de Ca^{2+} (Maksimova *et al.*, 2019). Por ello, se decidió estudiar el efecto de la despolarización sobre los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y con ello, observar si se identificaban células que seguían generando dichos movimientos de Ca^{2+} aún en presencia del agonista. De acuerdo con esto, se esperaba que, de acuerdo con la edad del animal utilizado, al menos el 70% de las células generaran movimientos intracelulares de Ca^{2+} en respuesta al alto K^+ . En nuestros

resultados se observó que el 85% (n = 12/14) de las células del BO generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} en respuesta a la aplicación de 20 mM de K^+ (**Figura 14D**).

Debido a que poco se sabe sobre el efecto de los ácidos grasos de cadena corta en el SNC y más aún sobre las células del BO, se decidió a utilizar ácido acético para identificar si las células generaban movimientos intracelulares de Ca^{2+} evocados por el ácido acético, ya que en áreas corticales está documentado que las células poseen receptores que reconocen a estos ácidos grasos y que este proceso, produce la liberación de Ca^{2+} del RE (Kimura *et al.*, 2020). Por esta razón, se esperaba que una pequeña población de células menor al 20% y distribuidas entre la CPE, CM y CPI, generaran movimientos intracelulares de Ca^{2+} en respuesta a la aplicación de ácido acético. Sin embargo, en nuestros resultados se observó que solamente el 4% (n = 7/170) de las células generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} en respuesta a la aplicación de 1 μM de ácido acético (**Figura 14E**).

Interesante, los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos ya no fueron generados por las células del BO después de la aplicación de los estímulos. De este modo, la estimulación de las células generó estados de inactividad después de la estimulación, a excepción de las células estimuladas con ATP, ya que éstas generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} de duración prolongada. Lo cual podría deberse a que posiblemente las células se encuentren en un periodo refractario en el que intentan mantener las condiciones fisiológicas intracelulares y con ello, inhibiendo ciertos mecanismos utilizados para generar flujos de Ca^{2+} . Posiblemente por esta razón, durante el tiempo del registro, las células no generaron movimientos intracelulares. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que, en un tiempo mayor a 5 min, las células recuperen la capacidad para producir movimientos intracelulares de Ca^{2+} .

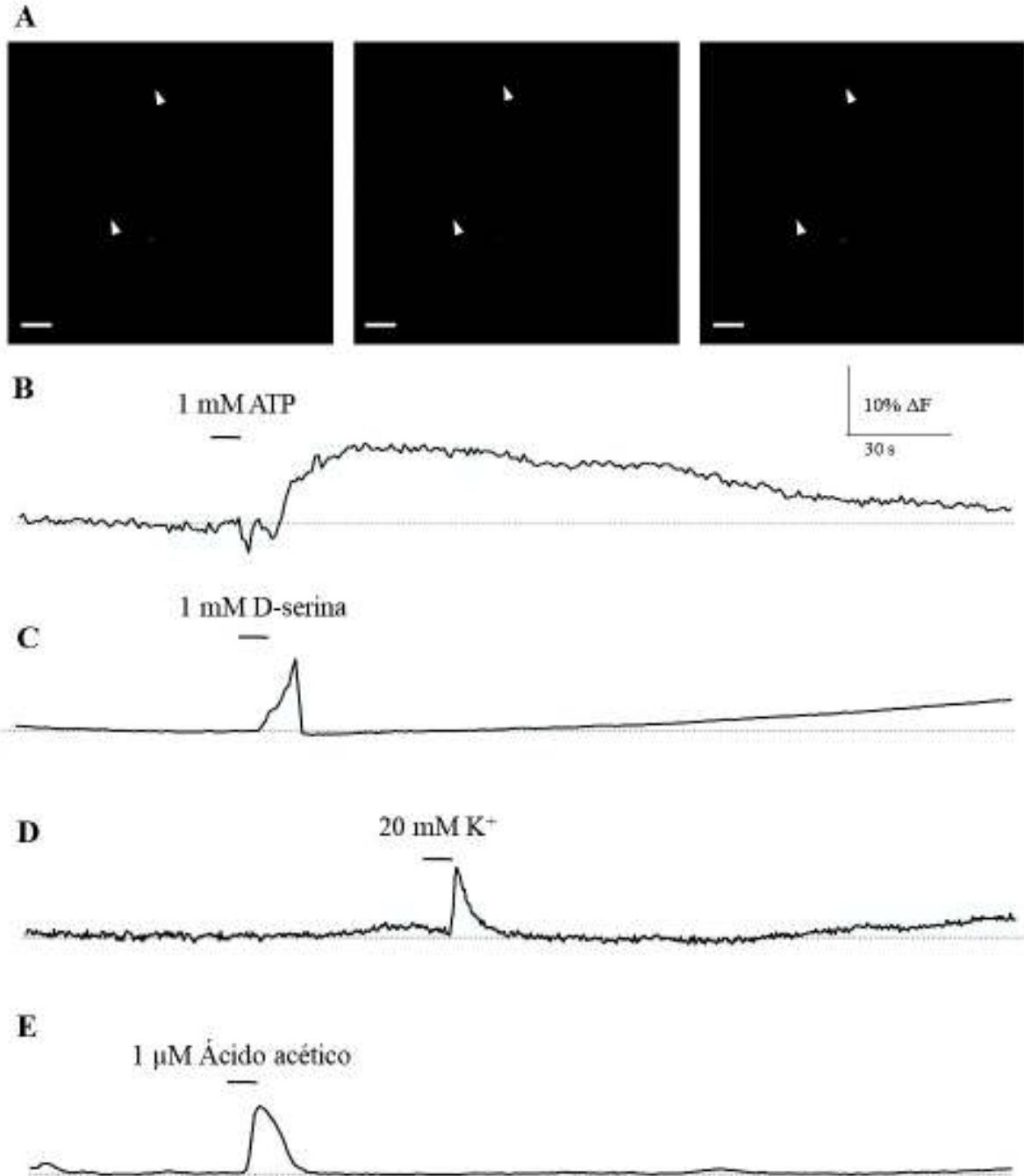


Figura 14. Movimientos intracelulares de Ca^{2+} inducidos por agonistas. En **A**, se muestra una célula representativa que generó un movimiento intracelular de Ca^{2+} en respuesta a las sustancias utilizadas. De **B-E** se muestran experimentos representativos de células que respondieron con movimientos intracelulares de Ca^{2+} a la aplicación de: **B**, 1 mM de ATP (1 rebanada/1 rata P15); **C**, 1 mM de D-serina (1 rebanada/1 rata P16); **D**, 20 mM de K^+ (1 rebanada/1 rata P11) y **E**, 1 μM de ácido acético (6 rebanadas/4 ratas; P8, P12, P15 y P20).

Se realizó un análisis estadístico no paramétrico mediante la prueba de Friedmann para observar si existen diferencias significativas entre las células que generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} en respuesta a las sustancias utilizadas para estimular a las células. De acuerdo con dicho análisis, existe suficiente evidencia estadística para mostrar que las respuestas generadas por las células tienen diferencias significativas ($p = 0.039$). Sin embargo, al ser un grupo de cuatro parámetros (ATP, D-serina, 20 mM de K^+ y ácido acético), se realizó la prueba de Bonferroni para identificar entre cuales grupos de células existían diferencias significativas (**Tabla 1**). Se observó que el grupo de células estimuladas con 20 mM de K^+ y ácido acético presentaron diferencias significativas ($p = 0.025$) entre ellos, con respecto al número de células que respondieron a la aplicación de dichos agonistas. Los grupos de células estimuladas con D-serina y ATP, no presentaron diferencias significativas debido a que el número de respuestas es similar.

Tabla 1. Prueba de Bonferroni para identificar diferencias significativas entre los grupos de células que respondieron a 1 mM de ATP, 20 mM de K^+ , 1 mM de D-serina y 1 μM de ácido acético. Se muestran diferencias significativas entre el grupo de células estimulado con 20 mM de K^+ y el grupo de células estimulado con ácido acético.

	ATP	K^+	D-SERINA	ACÉTICO
ATP	1	0.486	1.000	0.486
K^+	0.486	1	0.486	0.025
D-SERINA	1.000	0.486	1	0.486
ACÉTICO	0.486	0.025	0.486	1

Al analizar los movimientos intracelulares de Ca^{2+} evocados por agonistas, se observó que las células generaron respuestas a la aplicación de las sustancias con diferentes características temporales. Sin embargo, los movimientos intracelulares de Ca^{2+} evocados por ATP siguieron una distribución similar y por ello se consideraron como respuestas sin variación. En la **Figura 14** se mostraron trazos representativos de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} inducidos por agonistas. En los movimientos intracelulares de Ca^{2+} inducidos por D-serina ($n = 18$), se observó que las células tuvieron un crecimiento exponencial con $\tau 6.62 \pm 0.93$ s y decaimiento exponencial con $\tau 2.41 \pm 0.63$ s. Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} inducidos por 20 mM

de K^+ , se observó que el 75% ($n = 9$) de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} tuvieron decaimiento exponencial con $\tau 9.32 \pm 0.39$ s y el 25% ($n = 3$) generó 2 movimientos intracelulares de Ca^{2+} (ambos) con decaimiento exponencial con $\tau 46.24 \pm 8.38$ s. Las células que generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} inducidos por ácido acético tuvieron un crecimiento exponencial de $\tau 10.5 \pm 2.1$ s y decaimiento exponencial de $\tau 18.44 \pm 3.21$ s ($n = 4$).

Los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en respuesta a diferentes agonistas se han estudiado ampliamente en células del SNC. En el BO, está documentado qué tipo de receptores purinérgicos expresan las neuronas y las células gliales, dentro de ellos se encuentran los de tipo P2Y y P2X. En particular, los astrocitos de BO expresan receptores de tipo P2Y₁ y responden a la aplicación de ATP con movimientos intracelulares de Ca^{2+} . Estas respuestas se producen por la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares de los astrocitos, ya que los receptores P2Y₁ al ser receptores acoplados a proteínas G, inducen la producción de IP₃ y con ello, la activación de los receptores de IP₃ del RE y generando la liberación de Ca^{2+} hacia el citosol (Doengi *et al.*, 2008; Droste *et al.*, 2017). Debido a que aproximadamente el 60% de las células del SNC son células gliales y que los astrocitos componen una gran parte de las células gliales, el porcentaje de respuesta de las células del BO encontradas en este trabajo de investigación es similar al porcentaje de células reportada en diversos estudios (Tower y Young., 1973; Verkhratsky y Nedergaard, 2018; Kastanenka *et al.*, 2020). Beiersdorfer y colaboradores (2019) han descrito que no todos los astrocitos del BO responden con movimientos intracelulares de Ca^{2+} a la aplicación de ATP. Actualmente hay evidencia de que las neuronas del BO no generan movimientos intracelulares de Ca^{2+} en respuesta a la aplicación de ATP, esto puede ser causa de la degradación del mismo ATP produciendo el nucleótido adenosina, el cual activa receptores de tipo A₁ en las interneuronas del BO, particularmente en las células mitrales. La activación de receptores de adenosina de tipo A₁ inhibe canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo N, Q y P (Schulz *et al.*, 2018). Por esta razón, se considera que la mayoría de las células que respondieron al ATP son de origen glial.

Dentro de la comunicación celular del BO, las células estudiadas en este trabajo de investigación generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} cuando se aplicó D-serina. Este fenómeno se produce debido a que las células utilizan D-serina para estimular los receptores

NMDA, ya que éstos poseen un sitio específico de glicina capaz de responder a D-serina, produciendo la apertura del canal iónico y, por lo tanto, permitiendo el paso de iones como el Ca^{2+} al interior de la célula. Está evidenciado que las principales células del SNC que utilizan D-serina son las neuronas, astrocitos y microglía, favoreciendo procesos como la plasticidad sináptica y a su vez, fungiendo como un generador de oscilaciones de Ca^{2+} en las células gliales. La actividad de los receptores NMDA puede ser modulada por la D-serina y que ésta juega un papel importante en el desarrollo temprano del cerebro, así como en procesos patológicos del SNC (Van Horn *et al.*, 2013; Perez *et al.*, 2017; Droste *et al.*, 2017). En este sentido, las células que respondieron a la D-serina pudieran encontrarse en un periodo de inactividad después de la estimulación y esto probablemente produjo que ya no se generara movimientos intracelulares de Ca^{2+} .

De acuerdo con los resultados obtenidos estimulando con 20 mM de K^+ , el 85% de las células generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} en respuesta al alto K^+ , esto podría deberse a que las células del SNC tienen la capacidad de responder a variaciones en la concentración extracelular de iones como en aumento o disminución en la concentración extracelular de K^+ (Verkhratsky *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2020). En altas concentraciones de K^+ se produce la despolarización de las células, específicamente en astrocitos, se expresan diferentes canales de K^+ como de tipo B_K y K_ir que están relacionados con canales de Ca^{2+} de tipo TRP (Doupnik *et al.*, 1995). Sin embargo, hay evidencia que sugiere que la activación de receptores de adenosina de tipo A_1 en células mitrales, produce la activación de canales de K^+ , produciendo la despolarización de las células. Actualmente hay información que sugiere que eventos despolarizantes en el BO, favorecen al procesamiento de la información olfativa para que ésta sea transmitida a otras regiones del cerebro que están asociadas con el olfato (Rotermund *et al.*, 2018).

Cuando se utilizó ácido acético para estimular a las células del BO, se encontró que solamente en el 4% de las células se generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} , pero actualmente el impacto que tiene este ácido en el SNC no está bien estudiado. Existe evidencia que sugiere en mamíferos, que los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son reconocidos por dos tipos de receptores, el GPR41 y GPR43, ambos ya descritos en diversas estructuras del sistema nervioso central y del sistema nervioso periférico. La interacción de estos receptores

con su agonista desencadena mecanismos intracelulares para provocar movimientos intracelulares de Ca^{2+} . Actualmente, existe información que muestra que algunas neuronas de ciertas áreas del SN expresan estos receptores, por ejemplo, la glándula pituitaria y en el sistema nervioso autónomo (Nøhr *et al.*, 2013; Nøhr *et al.*, 2015). El GPR41 y GPR43 son receptores acoplados a proteínas G, éstos desencadenan reacciones intracelulares al ser activados por el ácido acético (Miyamoto *et al.*, 2016; Kimura *et al.*, 2020). A diferencia de los estudios publicados sobre la acción del ácido acético en las células del SN, en células del BO la respuesta a la aplicación de ácido acético generó movimientos intracelulares de Ca^{2+} diferentes a las reportadas previamente en células mesentéricas celiacas y en la pituitaria, esto podría deberse a los diferentes modelos de experimentación y a las diferentes células que se analizaron ya que en las demás estructuras, las células se mantenían en un estado “activado” donde solamente aumentaban la concentración intracelular de Ca^{2+} durante los experimentos, mientras que en nuestro modelo experimental, las células generaban movimientos intracelulares de Ca^{2+} evocados y volvían al estado basal. De este modo, una posible causa que pudiera explicar este fenómeno sería que la concentración utilizada de ácido acético permitió que las células no entraran en estados de sobre estimulación, ya que en las publicaciones consultadas se utilizaban concentraciones de hasta 4 mM de AGCC, como butirato y propionato (Miletta *et al.*, 2014; Colina *et al.*, 2018), mientras que en nuestros experimentos se utilizó ácido acético en una concentración de 1 μM , lo que podría favorecer a las células a volver a su estado basal y evitando que se mantuvieran en estados de activación prolongada.

De acuerdo con estos experimentos, los movimientos intracelulares de Ca^{2+} dependen tanto de las células gliales como de las neuronas porque después de la estimulación de las células del BO con los agonistas previamente mencionados, las células se mantuvieron en estado basal y por lo tanto no generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} . Una posible explicación para este fenómeno podría ser que las células se encuentran en un periodo refractario o bien, en un periodo de reposo o desensibilización en el que se mantienen inactivas durante varios minutos, indicando que sería necesario realizar un análisis para estudiar cuanto tiempo requieren las células para volver a generar movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y sincrónicos en el BO de la rata. Sin embargo, se necesitan realizar más estudios para observar la actividad celular durante la post aplicación de agonistas.

V.5. Inmunohistoquímica

Una vez realizados los registros de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en las células del BO, el tejido se cortó para aislar el área del BO donde se realizó el registro, se fijó y se realizaron estudios de inmunohistoquímica para identificar a la proteína ácido gliofibrilar (GFAP) en las células que generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos. En la **Figura 15A** se muestra una célula cargada con Fluo 4-AM que generó movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y en la **Figura 15B**, la misma célula donde se observa que es GFAP positiva. De las células ($n = 64$) que generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos, aproximadamente el 5% ($n = 3.2/64$) de dichas células son positivas para la GFAP. De este modo, se realizó un conteo de células positivas para GFAP para observar la distribución de los astrocitos/ mm^2 en BO (**Figura 15C**). La mayor cantidad de células positivas para GFAP se obtuvo en la CPI con 33 ± 3 ($n = 197$) células/ mm^2 que expresaron la GFAP. En la CM, se obtuvo que 16 ± 3 ($n = 93$) células/ mm^2 eran positivas para GFAP. Finalmente, en la CPE solamente 9 ± 2 ($n = 56$) células/ mm^2 resultaron positivas para GFAP. De acuerdo con estos datos, se estimó que el 20% de las células positivas para GFAP, generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos. Por ello, se observó que la cantidad de células positivas para GFAP y que además generaban movimientos intracelulares de Ca^{2+} se encontraban distribuidas de la siguiente manera, en la CPI 7.1, CM 4.1 y CPE 4.8 células.

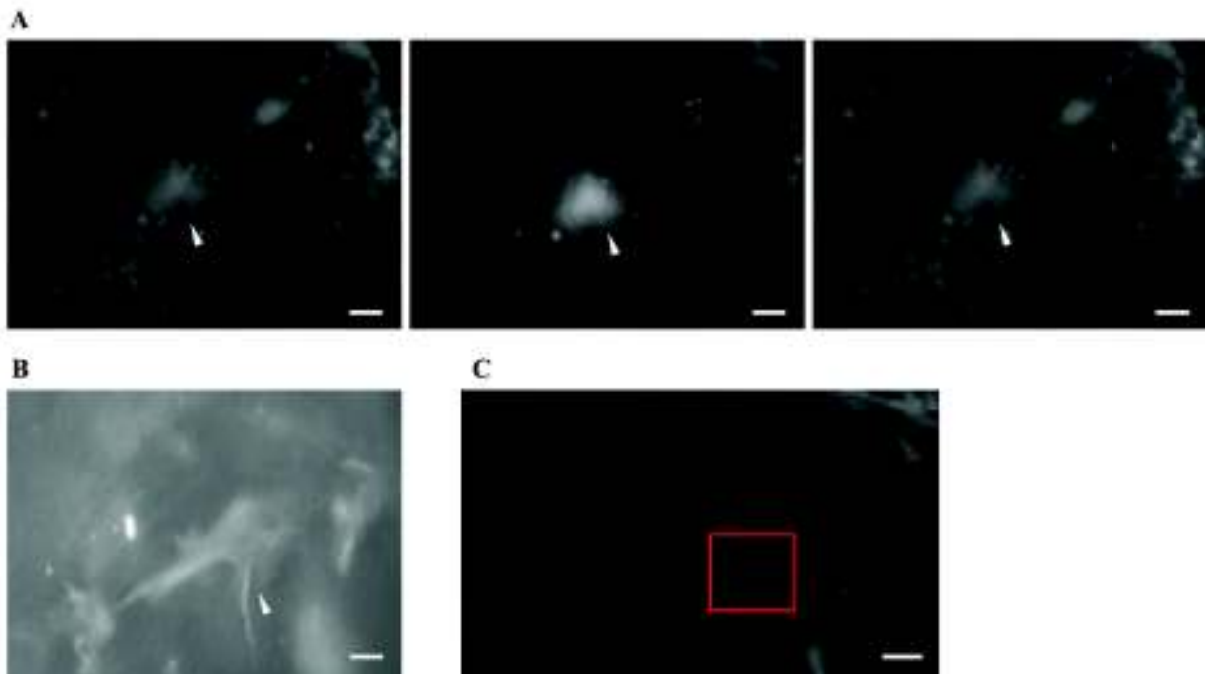


Figura 15. Inmunohistoquímica para la identificación de la GFAP en BO (3 rebanadas/3 ratas; P10, P16 y P20). En **A**, se muestra una célula representativa que generó movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos. En **B**, se muestra la célula que generó movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos en **A** positiva para GFAP. En **C**, se muestra un área de 1 mm^2 donde se realizó el conteo de células positiva para GFAP/ mm^2 . En **A** y **B**, barra de calibración = $10 \mu\text{m}$. En **C**, barra de calibración = $50 \mu\text{m}$.

Una vez identificado que una fracción (5%) de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos son generados por los astrocitos, se realizó una correlación de Pearson para identificar si existe una relación entre el número de células que generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos con las células GFAP positivas. El análisis mostró que existe una correlación lineal entre ambas variables de estudio con un coeficiente de Pearson $r = 0.984$ y un nivel de significancia de $p = 0.04$. Esta información muestra que si aumenta el número de células que producen movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos en una rebanada, la cantidad de células positivas para GFAP también lo haría, produciendo que ambas variables incrementen de manera lineal. En la **Tabla 3** se muestra que existe correlación positiva entre el número movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos producidos y el número de astrocitos identificados mediante la inmunohistoquímica.

Tabla 2. Correlación positiva entre las células que generan movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y las células identificadas como astrocitos (GFAP+), con un nivel de significancia de $p = 0.04$.

Variables	Células que generan movimientos intracelulares de Ca^{2+}	Astrocitos
Células que generan movimientos intracelulares de Ca^{2+}	1	0.984
Astrocitos	0.984	1

De acuerdo con las investigaciones realizadas por Beiersdorfer y colaboradores (2019), las células gliales, en particular los astrocitos del BO mantienen comunicación activa con las demás células del BO través de una estrecha red de comunicación bidireccional para movilizar el Ca^{2+} de una célula a otra. Está información previamente publicada sugiere que los astrocitos participan en la comunicación olfativa con la generación de movimientos intracelulares de Ca^{2+} , que son necesarios para el procesamiento de la información olfativa y que, además, probablemente podrían intervenir en la unión neurovascular secretando diversos gliotransmisores (Fischer *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020). Sin embargo, el BO al estar compuesto de diferentes tipos de células, se deberían de realizar más estudios para identificar la influencia de los diferentes tipos de interneuronas, células gliales y células endoteliales sobre los movimientos intracelulares de Ca^{2+} producidos en las redes de comunicación del BO.

V.6. Histología del BO

Después de la identificación de los astrocitos (inmunohistoquímica-GFAP), se estudió la distribución celular en las rebanadas de BO utilizadas para registrar los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos. La **Figura 16** muestra cortes coronales de BO de rata con impregnación Golgi Cox rápida y hematoxilina-eosina. La primera, impregna en color negro a las células mitrales/penacho que llegan a tener un tamaño de hasta $30 \mu\text{m}$ en el BO (Nagayama *et al.*, 2014). La tinción hematoxilina eosina se utilizó para obtener un contraste de células que se impregnan en color negro. Esta tinción tiñe de color morado el núcleo de las células y el citoplasma de un color rosado (Chan, 2014). Por esta razón, en la **Figura 16** se observan los

somas celulares de las células mitrales/penacho en color negro, mientras que el resto de las células están en color morado. La distribución de las células en la CPE, CPM y CPI permitió identificar el arreglo estructural característico del BO. Con ello, se realizó el conteo de células/mm² en la CPE, CM y CPI del BO. Con la tinción hematoxilina-eosina, se realizó el conteo de los núcleos que se encontraban entre las capas del BO previamente mencionadas. La CPE presentó una densidad celular de 37 células/mm², la CM presentó una densidad celular de 78 células/mm² y la CPI tuvo una densidad celular de 92 células/mm².

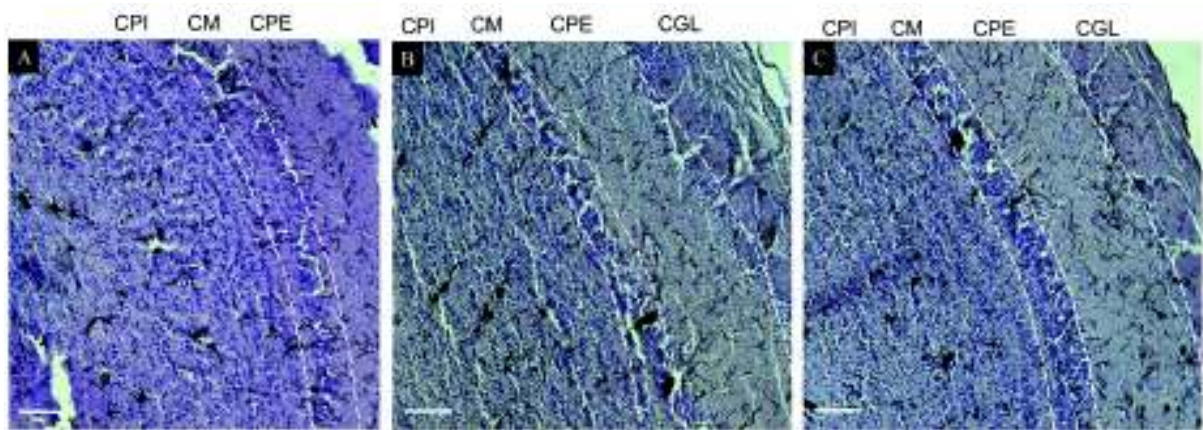


Figura 16. Histología de BO de rata en corte coronal con impregnación Golgi-Cox rápida y hematoxilina-eosina. En **A**, se observa un corte coronal de BO de rata P7. En **B**, se observa un corte coronal de BO de rata P16. En **C**, se observa un corte coronal de BO de rata P21. Capa Glomerular (CGL), Capa Plexiforme Externa (CPE), Capa Mitral (CM), Capa Plexiforme Interna (CPI). Barra de calibración = 50 μ m.

De acuerdo con los resultados obtenidos con las técnicas histológicas (inmunohistoquímica, impregnación Golgi-Cox rápida y tinción hematoxilina-eosina), se realizó una estimación del porcentaje que representan los astrocitos dentro de las capas del BO. Se observó que, en la CPE el 24% ($n = 9/37$), en la CM el 21% ($n = 16/78$) y en la CPI el 35% ($n = 33/92$) de las células presentes en son GFAP-positivos (astrocitos). Esta información es similar a la publicada por Klein *et al* (2020) donde se muestra que, en ratones, aproximadamente el 30% de las células del BO son astrocitos y que el porcentaje de estas células varía dependiendo de la edad del ratón.

La distribución celular del BO se ha estudiado ampliamente y se ha observado que el BO presenta diferentes tipos de capas que albergan a diferentes tipos de células. Sin embargo, estas capas del BO pueden contener células que deberían pertenecer a otra capa. En la CPE, se encuentran principalmente células en penacho, pero actualmente se sabe que esta capa de células presenta células de axón corto de gran tamaño, células de Van Gehuchten y células multipolares (Lepousez *et al.*, 2010). Asimismo, en la CM se observan dos distintos tipos de células mitrales, las de tipo-I y de tipo-II (Fukunaga *et al.*, 2012). En la CPI, se encuentran las células granulares de tipo-III y células de axón corto profundas, pero las células granulares también tienen distribución en la CM, donde habitan células granulares de tipo-V (Merkle *et al.*, 2014, Nagayama *et al.*, 2014). Estos tipos de células que se encuentran distribuidas en las diferentes capas del BO pudieran estar generando y contribuyendo a los movimientos intracelulares de Ca^{2+} . Sin embargo, se deberán realizar más estudios para comprobar que tipos de células están involucradas en este proceso.

Está evidenciado en el atlas de histología de Paxinos y Watson (2018) y por el grupo de investigación de Khazipov (2015), que el BO presenta una organización similar de sus capas durante el desarrollo postnatal, manteniendo características anatómicas similares en diferentes planos coronales en bregma (5.0-5.8 mm). En cuanto a la composición celular, Maslyukov y colaboradores (2018) han mostrado que se observan células inmaduras aún en etapas adultas y que, la expresión de receptores de membrana puede variar debido a los efectos producidos por el desarrollo del BO. En etapas de P0-7, las células del BO presentan menos especificidad por la información olfativa y un mismo grupo de células puede responder a diferentes estímulos (diferentes olores) en comparación con una rata P21. La actividad de receptores NMDA puede modificarse dependiendo de la edad del animal (Wenzel *et al.*, 1997; Díaz-Guerra *et al.*, 2013). A pesar de que las células inmaduras presentan menos especificidad, esta propiedad de inespecificidad se mantiene durante la vida de los mamíferos, ya que diariamente llegan células nuevas a través de la vía rostral migratoria, para formar nuevas conexiones celulares (Lim y Alvarez-Buylla, 2016).

De acuerdo con los resultados encontrados en este trabajo de investigación, la frecuencia de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos generados por las células del BO es diferente a las reportadas en otras áreas del cerebro (hipocampo y corteza) y que cuando se

utilizaron condiciones de 0 $\text{Ca}^{2+}_{\text{E}}$, las células del BO tenían la capacidad para seguir generando movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos. De acuerdo con las investigaciones realizadas por Rodríguez-Prado (2017), astrocitos corticales en condiciones de 0 $\text{Ca}^{2+}_{\text{E}}$, ya no generaban movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos, indicando que la generación de éstos es dependiente del $\text{Ca}^{2+}_{\text{E}}$. Sin embargo, una posible explicación de este fenómeno serían los modelos experimentales, ya que son distintas áreas del cerebro y en condiciones experimentales diferentes, en este trabajo de investigación se realizaron experimentos *in situ*. Por ello, haría falta realizar más estudios para comprobar si los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos dependen principalmente de los astrocitos o si éstos, son contribuidos por los movimientos intracelulares de Ca^{2+} generados por el resto de las neuronas y células gliales que conforman los ensambles celulares, ya que existe evidencia que muestra que los oligodendrocitos y la microglía, tienen la capacidad para generar movimientos intracelulares de Ca^{2+} (Korvers *et al.*, 2016; Rui *et al.*, 2020). Para ello, se deberían de realizar experimentos para inhibir a cada uno de los tipos celulares del BO para identificar si los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos son generados por la cooperación de la red células o si existe un mediador principal en la comunicación olfativa.

En el BO, las células tienen diversos mecanismos para la homeostasis del Ca^{2+} como ya se ha descrito en secciones anteriores. Sin embargo, las espinas dendríticas de las células del BO tienen receptores que movilizan Ca^{2+} , como por ejemplo, los receptores NMDA, que están asociados con la comunicación posináptica ya que la activación de estos receptores produce la entrada de Ca^{2+} hacia las dendritas de las células y con ello, activando mecanismos reguladores de las células vecinas, principalmente mecanismos de las células granulares ya que éstas mantienen funciones reguladores en la comunicación de las células mitrales/penacho (Spruston, 2008; Lage-Rupprecht *et al.*, 2020).

Debido a que en el BO la cantidad de conexiones dendro-dendríticas es mayor en comparación que en otras regiones del cerebro, gran parte de estas conexiones formadas en el BO pertenecen a circuitos inhibidores capaces de generar movimientos intracelulares de Ca^{2+} y transmitirlos a las células vecinas para generar corrientes de inhibición, este proceso crea corrientes inhibitorias de Ca^{2+} . La inhibición producida en el circuito olfativo tiene un rol principal en el BO, particularmente en el procesamiento de la información olfativa y en la

discriminación de los olores, ya que dentro del BO las células forman redes de comunicación que se activan específicamente cuando se reconocen los olores y que dependiendo del olor detectado, las células que generen movimientos intracelulares de Ca^{2+} van a ser las que estén formando conexión con el glomérulo que es activado por las NSO que reconocieron un olor en específico (Egger *et al.*, 2003; Bartel *et al.*, 2015; Arnson y Strowbridge, 2017). Gracias a que las corrientes inhibitorias generadas en el BO mantienen la regulación del circuito celular, posiblemente los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y sincrónicos pudieron ser generados por estos mecanismos de regulación tan importantes que tiene el BO.

En el BO, la organización anatómica tradicional está apegada a la clasificación de las capas que presenta el BO, pero hoy en día existe una amplia información sobre los diferentes tipos de células que se encuentran en el BO y que estas células, se encuentran distribuidas en el BO y no solamente en ciertas capas (Nagayama *et al.*, 2014). La organización anatómica de las células podría favorecer la comunicación en el BO, esto debido a que en el BO se crean arreglos de células para favorecer la activación de éstas durante el procesamiento de los olores. Dentro del circuito olfativo, las células mitrales y células en penacho forman comunicaciones laterales con las células vecinas, pudiendo generar movimientos intracelulares de Ca^{2+} sincrónicos en respuesta a la estimulación o inhibición causada por dicha comunicación (Geramita y Urban, 2016). Las células mitrales y las células en penacho generan proyecciones a otras regiones del cerebro que están asociadas con el olfato y, cada una de estas células se comunica en regiones diferentes de estas estructuras como, por ejemplo, las células mitrales se comunican en diferentes regiones de la corteza olfativa para lograr diferentes mecanismos de regulación y de almacenamiento de la información (Zeppilli *et al.*, 2021; Schlegel *et al.*, 2021). Sin embargo, estas conexiones que se forman con el epitelio y las demás regiones del cerebro se pierden cuando se extrae el BO, generando que solamente se activen mecanismos celulares del BO, principalmente de corrientes inhibitorias que pueden generar sincronización de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} para regular a las células e intentar mantenerlas en un estado de inactividad. Además, diversos mecanismos están implicados en la señalización de Ca^{2+} del BO y por ello, diferentes vías de comunicación se deberían de estudiar para comprender la comunicación celular del BO.

La espontaneidad y la sincronidad de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} se vio afectada cuando las células recibían un estímulo externo como la aplicación de ATP, D-serina, 20 mM de K^+ y ácido acético. Estas sustancias generan movimientos intracelulares de Ca^{2+} , activando mecanismos intracelulares que favorecen la liberación de reservorios intracelulares de Ca^{2+} (Fischer *et al.*, 2020). La razón por la cual las células pierden la capacidad de generar movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y sincrónicos, es debido a que a estas sustancias están involucrados en respuestas similares y necesitan de los mecanismos intracelulares para generar y mantener los movimientos intracelulares de Ca^{2+} . Muchos de estos mecanismos necesitan de la actividad del RE y en el caso del ATP y ácido acético, se pueden activar receptores acoplados a proteínas G que activan a la PLC para producir IP_3 , éste se une a los IP_3R del RE y genera la liberación de Ca^{2+} desde el interior del retículo hacia el citosol. Sin embargo, los receptores NMDA y P2X al ser canales catiónicos, producen la entrada de iones desde el medio extracelular hacia el interior de la célula, mientras que la despolarización por la aplicación de alto K^+ activa a canales de K^+ y de tipo TRP que no son específicos y con ello, generando movimientos intracelulares de Ca^{2+} en las células del BO (Rotermund *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019). En la **Figura 17** se representan los mecanismos que pudieran estar generando los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en las células del BO.

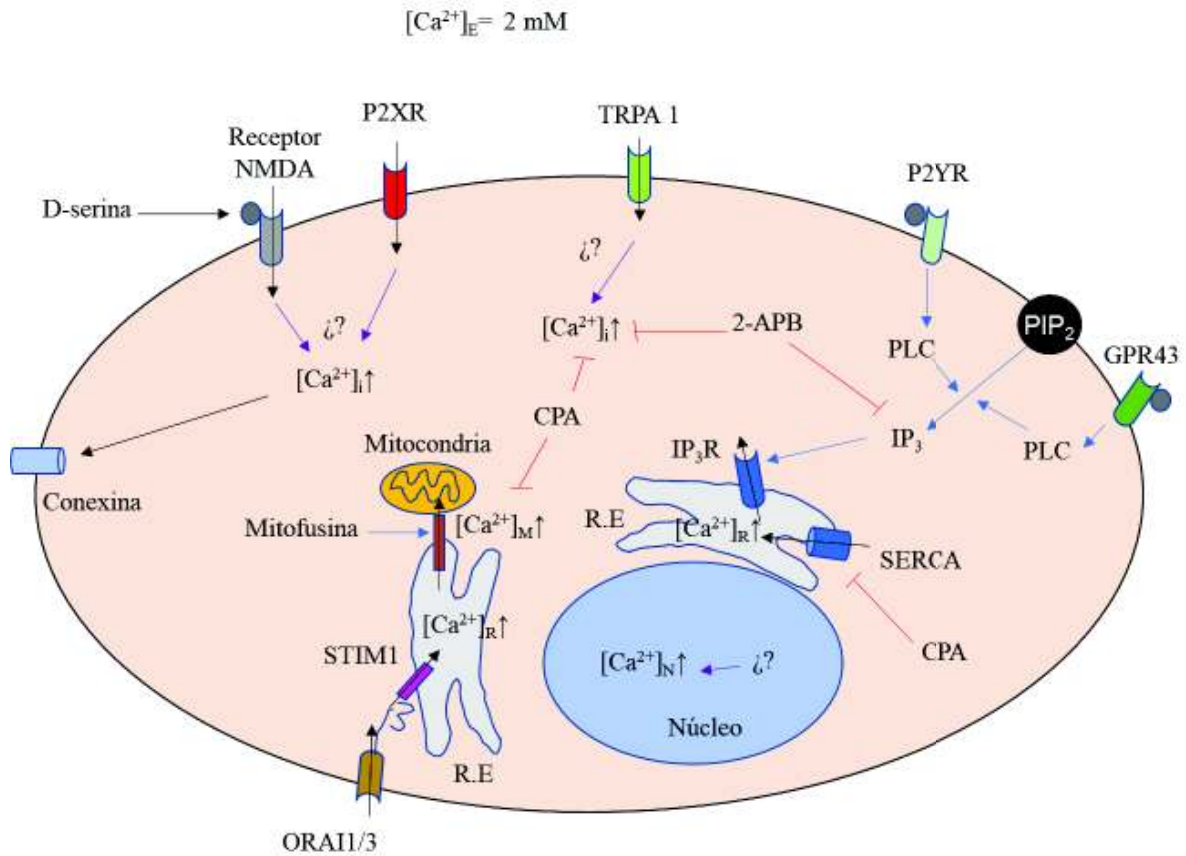


Figura 17. Representación de distintas vías de activación de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en células del BO de la rata postnatal. Concentración de Ca^{2+} extracelular $[Ca^{2+}]_E$. Receptor P2Y (P2YR). Receptor P2X (P2XR). Fosfolipasa C (PLC). Fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂). Receptor acoplado a proteínas G de tipo 43 (GPR43) para ácidos grasos de cadena corta. Inositol trifosfato (IP₃). Receptor de IP₃ (IP₃R). 2-aminoetildifenilborato (2-APB). Ácido ciclopiazónico (CPA). Concentración de Ca^{2+} intracelular $[Ca^{2+}]_i$. Concentración de Ca^{2+} mitocondrial $[Ca^{2+}]_M$. Concentración de Ca^{2+} nuclear $[Ca^{2+}]_N$.

VI. CONCLUSIÓN

Las células encontradas entre la capa plexiforme externa, capa plexiforme interna y la capa mitral del bulbo olfatorio de la rata postnatal producen movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y sincrónicos de baja frecuencia. La remoción del Ca^{2+} extracelular disminuyó el número de células que generaron movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos. Adicionalmente, se observó sincronización de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} en los ensambles celulares de BO en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular. La aplicación de ATP, D-serina, alto K^+ y ácido acético produjo movimientos intracelulares de Ca^{2+} en las células del bulbo olfatorio. El 2-APB evocó movimientos intracelulares de Ca^{2+} , mientras que el efecto del CPA no se pudo asociar a los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos, debido a la baja frecuencia de éstos. Aproximadamente el 5% de los astrocitos generó movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y sincrónicos encontradas en la capa plexiforme externa, capa mitral y capa plexiforme interna del bulbo olfatorio de la rata.

VII. RECOMENDACIONES

Con base a los resultados presentados anteriormente, se recomienda:

- Estudiar el efecto de la participación neuronal sobre los movimientos intracelulares de Ca^{2+} de las células del BO.
- Profundizar en la farmacología asociada a la generación de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} espontáneos y sincrónicos en las redes celulares del bulbo olfatorio de la rata.
- Evaluar la expresión molecular y la participación de los receptores de ácido acético en el bulbo olfatorio de la rata que conduzcan a entender su fisiología en el cerebro de la rata.

VIII. LITERATURA CITADA

- Ahmed, M. 2016. Steps of tissue processing in histopathology laboratory, Review Report. HEALTH DIGEST. 1. 26-27.
- Alberini, C. M., E. Cruz, G. Descalzi, B. Bessières y V. Gao. 2018. Astrocyte glycogen and lactate: New insights into learning and memory mechanisms. *Glia*. Jun;66(6):1244-1262. doi: 10.1002/glia.23250. Epub 2017 Oct 27. PMID: 29076603; PMCID: PMC5903986.
- Allen, N. J. y B. A. Barres. 2009. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*. Feb 5;457(7230):675-7. doi: 10.1038/457675a. PMID: 19194443.
- Araque, A. y M. Navarrete. 2010. Glial cells in neuronal network function. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365, 2375–2381. doi:10.1098/rstb.2009.0313
- Araque, A., V. Parpura, R. P. Sanzgiri y P. G. Haydon. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. May;22(5):208-15. doi: 10.1016/s0166-2236(98)01349-6. PMID: 10322493.
- Arnson, H. A. y B. W. Strowbridge. 2017. Spatial Structure of Synchronized Inhibition in the Olfactory Bulb. *J Neurosci*. 2017 Oct 25;37(43):10468-10480. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1004-17.2017. Epub 2017 Sep 25. PMID: 28947574; PMCID: PMC5656996.
- Aroniadou-Anderjaska, V., F. M. Zhou, C. A. Priest, M. Ennis y M. T. Shipley. 2000. Tonic and synaptically evoked presynaptic inhibition of sensory input to the rat olfactory bulb via GABA(B) heteroreceptors. *J Neurophysiol* 2000;84:1194–203.
- Baba-Aissa, F., L. Raeymaekers, F. Wuytack, L. Dode y R. Casteels. 1998. Distribution and isoform diversity of the organellar Ca²⁺ pumps in the brain. *Mol Chem Neuropathol*. Apr;33(3):199-208. doi: 10.1007/BF02815182. PMID: 9642673.
- Bakowski, D., C. Nelson y A. B. Parekh. 2012. Endoplasmic reticulum-mitochondria coupling: local Ca²⁺ signalling with functional consequences. *Pflugers Arch*. Jul;464(1):27-32. doi: 10.1007/s00424-012-1095-x. Epub 2012 Mar 14. PMID: 22415215.
- Bartel, D. L., L. Rela, L. Hsieh y C. A. Greer. 2015. Dendrodendritic synapses in the mouse olfactory bulb external plexiform layer. *The Journal of comparative neurology*, 523(8), 1145–1161. <https://doi.org/10.1002/cne.23714>.
- Baudoux, S. y D. Parker. 2008. Glial-toxin-mediated disruption of spinal cord locomotor network function and its modulation by 5-HT. *Neuroscience*. Jun 2;153(4):1332-43. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.034. Epub 2008 Mar 22. PMID: 18440149.
- Beck, A., R. Z. Nieden, H. P. Schneider y J. W. Deitmer. 2004. Calcium release from intracellular stores in rodent astrocytes and neurons in situ. *Cell Calcium* 35:47–58.
- Beiersdorfer, A., A. Scheller, F. Kirchhoff y C. Lohr. 2019. Panglial gap junctions between astrocytes and olfactory ensheathing cells mediate transmission of Ca²⁺ transients and neurovascular coupling. *Glia*. Jul;67(7):1385-1400.

- Berridge, M. J., M. D. Bootman y H. L. Roderick. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 517–529.
- Bettler, B., K. Kaupmann, J. Mosbacher y M. Gassmann. 2004. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev.* Jul;84(3):835-67. doi: 10.1152/physrev.00036.2003. PMID: 15269338.
- Bezzi, P., V. Gunderson, J. L. Galbete, G. Seifert, C. Steinhäuser, E. Pilati y A. Volterra. 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci.* Jun;7(6):613-20. doi: 10.1038/nn1246. Epub 2004 May 23. PMID: 15156145.
- Blaustein, M. P., M. Juhaszova, V. A. Golovina, P. J. Church y E. F. Stanley. 2002. Na⁺/Ca²⁺ exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications. *Ann N Y Acad Sci.* Nov;976:356-66. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04762.x. PMID: 12502582.
- Bloodgood, B. L., A. J. Giessel y B. L. Sabatini. 2009. Biphasic synaptic Ca influx arising from compartmentalized electrical signals in dendritic spines. *PLoS biology*, 7(9), e1000190. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000190>.
- Bootman, M. D., T. J. Collins, L. Mackenzie, H. L. Roderick, M. J. Berridge y C. M. Peppiatt. 2002. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *FASEB J.* 2002 Aug;16(10):1145-50. doi: 10.1096/fj.02-0037rev. PMID: 12153982.
- Boyd, A. M., J. F. Sturgill, C. Poo y J. S. Isaacson. 2012. Cortical feedback control of olfactory bulb circuits. *Neuron* 76:1161–74.
- Butenko, O., D. Dzamba, J. Benesova, P. Honsa, V. Benfenati, V. Rusnakova, S. Ferroni y M. Anderova. 2012. The increased activity of TRPV4 channel in the astrocytes of the adult rat hippocampus after cerebral hypoxia/ischemia. *PLoS One.* 7(6):e39959. doi: 10.1371/journal.pone.0039959. Epub 2012 Jun 27. PMID: 22761937; PMCID: PMC3384594.
- Camello, C., J. A. Pariente, G. M. Salido y P. J. Camello. 2000. Role of proton gradients and vacuola H⁽⁺⁾-ATPases in the refilling of intracellular calcium stores in exocrine cells. *Curr Biol.* 2000 Feb 10;10(3):161-4. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00313-4. PMID: 10679325.
- Capote, J., P. Bolaños, R. P. Schuhmeier, W. Melzer y C. Caputo. 2005. Calcium transients in developing mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 2005 Apr 15;564(Pt 2):451-64. doi: 10.1113/jphysiol.2004.081034. Epub 2005 Feb 24. Erratum in: *J Physiol.* 2005 May 1;564(Pt 3):953. PMID: 15731192; PMCID: PMC1464444.
- Chan, J. K. 2014. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol.* Feb;22(1):12-32. doi: 10.1177/1066896913517939. Epub 2014 Jan 9. PMID: 24406626.
- Chen, T. W., B. J. Lin y D. Schild. 2009. Odor coding by modules of coherent mitral/tufted cells in the vertebrate olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 17;106(7):2401-6. doi: 10.1073/pnas.0810151106. Epub Jan 30. PMID: 19181842; PMCID: PMC2650168.

- Cheng, K. T., H. L. Ong, X. Liu y I. S. Ambudkar. 2013. Contribution and regulation of TRPC channels in store-operated Ca²⁺ entry. *Curr Top Membr.* 2013;71:149-79. doi: 10.1016/B978-0-12-407870-3.00007-X. PMID: 23890115; PMCID: PMC3824975.
- Colina, C., H. L. Puhl y S. R. Ikeda. 2018. Selective tracking of FFAR3-expressing neurons supports receptor coupling to N-type calcium channels in mouse sympathetic neurons. *Sci Rep.* Nov 26;8(1):17379. doi: 10.1038/s41598-018-35690-z. PMID: 30478340; PMCID: PMC6255804.
- Corthell, J. T., D. A. Fadool y P. Q. Trombley. 2012. Connexin and AMPA receptor expression changes over time in the rat olfactory bulb. *Neuroscience.* Oct 11;222:38-48. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.070. Epub Jul 17. PMID: 22813997; PMCID: PMC3605311.
- Covelo, A. y A. Araque. 2018. Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. Department of Neuroscience, University of Minnesota, Minneapolis, United States. *eLife.* 7: e32237. <https://doi.org/10.7554/eLife.32237>.
- Debarbiux, F., E. Audinat y S. Charpak. 2003. Action potential propagation in dendrites of rat mitral cells *In vivo*. *The Journal of Neuroscience,* 23(13):5553–5560.
- Deitmer, J. W., A. J. Verkhratsky y C. Lohr. 1998. Señalización de calcio en células gliales. *Cell Calcium,* 24(5–6), 405–416. doi: 10.3389/fnana.2016.00038
- Díaz-Guerra, E., J. Pignatelli, V. Nieto-Estévez y C. Vicario-Abejón. 2013. Transcriptional regulation of olfactory bulb neurogenesis. *Anat Rec (Hoboken).* 2013 Sep;296(9):1364-82. doi: 10.1002/ar.22733. Epub Jul 31. PMID: 23904336.
- Djurisic, M., M. Popovic, N. Carnevale y D. Zecevic. 2008. Functional structure of the mitral cell dendritic tuft in the rat olfactory bulb. *J Neurosci.* Apr 9;28(15):4057-68. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5296-07.2008. PMID: 18400905; PMCID: PMC6670455.
- Doengi, M., J. W. Deitmer y C. Lohr. 2008. New evidence for purinergic signaling in the olfactory bulb: A2A and P2Y1 receptors mediate intracellular calcium release in astrocytes. *FASEB J.* 2008 Jul;22(7):2368-78. doi: 10.1096/fj.07-101782. Epub Feb 29. PMID: 18310463.
- Domenichini, F., E. Terrié, P. Arnault, T. Harnois, C. Magaud, P. Bois, B. Constantin y V. Coronas. 2018. Store-Operated Calcium Entries Control Neural Stem Cell Self-Renewal in the Adult Brain Subventricular Zone. *Stem Cells.* May;36(5):761-774. doi: 10.1002/stem.2786. Epub Feb 1. PMID: 29359518.
- Doupnik, C. A., N. Davidson y H. A. Lester. 1995. The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol.* Jun;5(3):268-77. doi: 10.1016/0959-4388(95)80038-7. PMID: 7580148.
- Droste, D., G. Seifert, L. Seddar, O. Jädtke, C. Steinhäuser y C. Lohr. 2017. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in mouse olfactory bulb astrocytes. *Sci Rep.* Mar 21;7:44817. doi: 10.1038/srep44817. PMID: 28322255; PMCID: PMC5359673.
- Duque, J. 2003. Crestas neurales, placodas y arcos branquiales: una revisión evolutiva y embriológica de datos básicos y recientes. *Rev Acad Colomb.* 27(103): 291-307.

- Egger, V. y O. Stroh. 2009. Calcium buffering in rodent olfactory bulb granule cells and mitral cells. *J Physiol*. Sep 15;587(Pt 18):4467-79. doi: 10.1113/jphysiol.2009.174540. Epub 2009 Jul 27. PMID: 19635818; PMCID: PMC2766651.
- Egger, V., K. Svoboda y Z. F. Mainen. 2003. Mechanisms of Lateral Inhibition in the Olfactory Bulb: Efficiency and Modulation of Spike-Evoked Calcium Influx into Granule Cells. *Journal of Neuroscience* 20 August 2003, 23 (20) 7551-7558; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-20-07551.2003.
- Evans, R. C., Y. M. Maniar y K. T. Blackwell. 2013. Dynamic modulation of spike timing-dependent calcium influx during corticostriatal upstates. *J Neurophysiol*. 2013 Oct;110(7):1631-45. doi: 10.1152/jn.00232.2013. Epub 2013 Jul 10. PMID: 23843436; PMCID: PMC4042418.
- Fischer, T., P. Scheffler y C. Lohr. 2020. Dopamine-induced calcium signaling in olfactory bulb astrocytes. *Scientific reports, Nature research*. 10:631. doi.org/10.1038/s41598-020-57462-4.
- Fomin-Thunemann, N., Y. Kovalchuk, S. Fink, A. Alsema, N. Mojtahedi, E. Zirdum y O. Garaschuk. 2020. Unique Functional Properties of Mature Adult-Born Neurons in the Mouse Olfactory Bulb. *Stem Cell Reports*. Dec 8;15(6):1333-1346. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.10.010. Epub 2020 Nov 19. PMID: 33217326; PMCID: PMC7724478.
- Foncelle, A., A. Mendes, J. Jędrzejewska-Szmek, S. Valtcheva, H. Berry, K. T. Blackwell y L. Venance. 2018. Modulation of Spike-Timing Dependent Plasticity: Towards the Inclusion of a Third Factor in Computational Models. *Front Comput Neurosci*. 2018 Jul 3;12:49. doi: 10.3389/fncom.2018.00049. PMID: 30018546; PMCID: PMC6037788.
- Fresu, L., A. Dehpour, A. A. Genazzani, E. Carafoli y D. Guerini. 1999. Plasma membrane calcium ATPase isoforms in astrocytes. *Glia*. Nov;28(2):150-5. PMID: 10533058.
- Fukunaga, I., M. Berning, M. Kollo, A. Schmaltz y A. T. Schaefer. 2012. Two distinct channels of olfactory bulb output. *Neuron*. 2012 Jul 26;75(2):320-9. doi: 10.1016/j.neuron.2012.05.017. PMID: 22841316.
- Gajardo-Gómez, R., V. C. Labra y J. A. Orellana. 2016. Connexins and Pannexins: New Insights into Microglial Functions and Dysfunctions. *Front Mol Neurosci*. Sep 22;9:86. doi: 10.3389/fnmol.2016.00086. PMID: 27713688; PMCID: PMC5031785.
- Galione, A. y M. Ruas. 2005. NAADP receptors. *Cell Calcium*. Sep-Oct;38(3-4):273-80. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.031. PMID: 16111747.
- Garaschuk, O., J. Linn, J. Eilers y A. Konnerth. 2000. Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci*. May;3(5):452-9. doi: 10.1038/74823. PMID: 10769384.
- Geramita, M. y N. N. Urban. 2016. Postnatal Odor Exposure Increases the Strength of Interglomerular Lateral Inhibition onto Olfactory Bulb Tufted Cells. *J Neurosci*. 2016 Dec 7;36(49):12321-12327. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1991-16.2016. PMID: 27927952; PMCID: PMC5148224.

- Gu, X., E. C. Olson y N. C. Spitzer. 1994. Spontaneous neuronal calcium spikes and waves during early differentiation. *J Neurosci.* 1994 Nov;14(11 Pt 1):6325-35. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-11-06325.1994. PMID: 7965039; PMCID: PMC6577261.
- Gu, X., W. Chen, N. D. Volkow, A. P. Koretsky, C. Du, y Y. Pan. 2018. Synchronized Astrocytic Ca²⁺ Responses in Neurovascular Coupling during Somatosensory Stimulation and for the Resting State. *Cell Rep.* Jun 26;23(13):3878-3890. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.091. PMID: 29949771; PMCID: PMC7469112.
- Hamilton, N., S. Vayro, F. Kirchhoff, A. Verkhratsky, J. Robbins, D. C. Gorecki y A. M. Butt. 2008. Mechanisms of ATP- and glutamate-mediated calcium signaling in white matter astrocytes. *Glia.* May;56(7):734-49. doi: 10.1002/glia.20649. PMID: 18293404.
- Hamilton, S. L. 2005. Ryanodine receptors. *Cell Calcium.* Sep-Oct;38(3-4):253-60. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.037. PMID: 16115682.
- Hogan, P. G., R. S. Lewis y A. Rao. 2010. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* 28, 491–533.
- Hsia, A. Y., J. D. Vincent y P. M. Lledo. 1999. Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb. *J Neurophysiol* 1999;82:1082–5.
- Huang, A. Y., J. Woo, D. Sardar, B. Lozzi, N. A. Bosquez-Huerta, C. J. Lin, D. Felice, A. Jain, A. Paulucci-Holthauzen y D. Deneen. 2020. Region-Specific Transcriptional Control of Astrocyte Function Oversees Local Circuit Activities. *Neuron.* Jun 17;106(6):992-1008.e9. doi: 10.1016/j.neuron.2020.03.025. Epub 2020 Apr 21. PMID: 32320644; PMCID: PMC7879989.
- Huang, Y. H. y D. E. Bergles. 2004. Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol.* Jun;14(3):346-52. doi: 10.1016/j.conb.2004.05.007. PMID: 15194115.
- Iadecola, C. y M. Nedergaard. 2007. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci.* Nov;10(11):1369-76. doi: 10.1038/nn2003. PMID: 17965657.
- Imai, T. 2014. Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Seminars in Cell & Development Biology* 35. 180-188.
- Inoue, T. y B. W. Strowbridge. 2008. Transient activity induces a long-lasting increase in the excitability of olfactory bulb interneurons. *J Neurophysiol.* Jan;99(1):187-99. doi: 10.1152/jn.00526.2007. Epub 2007 Oct 24. PMID: 17959743; PMCID: PMC6086124.
- Jonas, P. y J. Bischofberger. 1997. Action potential propagation into the presynaptic dendrites of rat mitral cells. *Journal of physiology* 504.2, pp.359-365.
- Kandel, E. 2000. *Principios de neurociencia* 4ª edición. McGraw-Hill Interamericana. Estados Unidos de América.
- Kastanenka, K. V., R. Moreno-Bote, M. De Pittà, G. Perea, A. Eraso-Pichot, R. Masgrau, K. E. Poskanzer y E. Galea. 2020. A roadmap to integrate astrocytes into Systems Neuroscience. *Glia.* Jan;68(1):5-26. doi: 10.1002/glia.23632. Epub 2019 May 6. PMID: 31058383; PMCID: PMC6832773.

- Kasubuchi, M., S. Hasegawa, T. Hiramatsu, A. Ichimura y I. Kimura. 2015. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients*. Apr 14;7(4):2839-49. doi: 10.3390/nu7042839. PMID: 25875123; PMCID: PMC4425176.
- Khazipov, R., D. Zaynutdinova, E. Ogievetsky, G. Valeeva, O. Mitrukhina, J. B. Manent y A. Represa. 2015. Atlas of the Postnatal Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Frontiers in neuroanatomy*, 9, 161. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00161>.
- Kilic, U., A. B. Caglayan, M. C. Beker, M. Y. Gunal, B. Caglayan, E. Yalcin, T. Kelestemur, R. Z. Gundogdu, B. Yulug, B. Yilmaz, B. E. Kerman y E. Kilic. 2017. Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice. *Redox Biol*. Aug;12:657-665. doi: 10.1016/j.redox.2017.04.006. Epub 2017 Apr 5. PMID: 28395173; PMCID: PMC5388917.
- Kimura, I., A. Ichimura, R. Ohue-Kitano y M. Igarashi. 2020. Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiol Rev*. Jan 1;100(1):171-210. doi: 10.1152/physrev.00041.2018. Epub 2019 Sep 5. PMID: 31487233.
- Kimura, I., D. Inoue, T. Maeda, T. Hara, A. Ichimura, S. Miyauchi, M. Kobayashi, A. Hirasawa y G. Tsujimoto. 2011. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 10;108(19):8030-5. doi: 10.1073/pnas.1016088108. Epub 2011 Apr 25. PMID: 21518883; PMCID: PMC3093469.
- Klein, M., C. Lohr y D. Droste. 2020. Age-Dependent Heterogeneity of Murine Olfactory Bulb Astrocytes. *Front Aging Neurosci*. 2020 Jun 9;12:172. doi: 10.3389/fnagi.2020.00172. PMID: 32581775; PMCID: PMC7296154.
- Korvers, L., A. de Andrade Costa, M. Mersch, V. Matyash, H. Kettenmann y M. Semtner. 2016. Spontaneous Ca²⁺ transients in mouse microglia. *Cell Calcium*. 2016 Dec;60(6):396-406. doi: 10.1016/j.ceca.2016.09.004. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27697289.
- Kovacs, G. G., A. Zsembery, S. J. Anderson, P. Komlosi, G. Y. Gillespie, P. D. Bell, D. J. Benos, y C. M. Fuller. 2005. Changes in intracellular Ca²⁺ and pH in response to thapsigargin in human glioblastoma cells and normal astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. Aug;289(2):C361-71. doi: 10.1152/ajpcell.00280.2004. Epub 2005 Mar 30. PMID: 15800052.
- Kraft, R. 2015. STIM and ORAI proteins in the nervous system. *Channels (Austin)*. 2015;9(5):245-52. doi: 10.1080/19336950.2015.1071747. Epub Jul 28. PMID: 26218135; PMCID: PMC4826113.
- Kwon, J., H. An, M. Sa, J. Won, J. L. Shin y C. J. Lee. 2017. Orai1 and Orai3 in Combination with Stim1 Mediate the Majority of Store-operated Calcium Entry in Astrocytes. *Exp Neurobiol*. 2017 Feb;26(1):42-54. doi: 10.5607/en.2017.26.1.42. Epub Feb 9. PMID: 28243166; PMCID: PMC5326714.
- Lage-Rupperecht, V., L. Zhou, G. Bianchini, S. S. Aghvami, M. Mueller, B. Rózsa, M. Sassoè-Pognetto y V. Egger. 2020. Presynaptic NMDARs cooperate with local spikes toward

- GABA release from the reciprocal olfactory bulb granule cell spine. *Elife*. 2020 Nov 30;9:e63737. doi: 10.7554/eLife.63737. PMID: 33252329; PMCID: PMC7704106.
- Latour, I., J. Hamid, A. M. Beedle, G. W. Zamponi y B. A. Macvicar. 2003. Expression of voltage-gated Ca²⁺ channel subtypes in cultured astrocytes. *Glia*. Mar;41(4):347-53. doi: 10.1002/glia.10162. PMID: 12555202.
- Lee J. H., L. Wei, T. C. Deveau, X. Gu S. P. Yu. 2016. Expression of the NMDA receptor subunit GluN3A (NR3A) in the olfactory system and its regulatory role on olfaction in the adult mouse. *Brain Struct Funct*. Jul;221(6):3259-73. doi: 10.1007/s00429-015-1099-3. Epub 2015 Sep 3. PMID: 26334321.
- Lepousez, G., Z. Csaba, V. Bernard, C. Loudes, C. Videau, J. Lacombe, J. Epelbaum y C. Viollet. 2010. Somatostatin interneurons delineate the inner part of the external plexiform layer in the mouse main olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 2010 Jun 1;518(11):1976-94. doi: 10.1002/cne.22317. PMID: 20394054.
- Lim, D. A. y A. Alvarez-Buylla. 2016. The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. May 2;8(5):a018820. doi: 10.1101/cshperspect.a018820. PMID: 27048191; PMCID: PMC4852803.
- Lin, Y., L. L. Li, W. Nie, X. Liu, A. Adler, C. Xiao, F. Lu, L. Wang, H. Han, X. Wang, W. B. Gan y H. Cheng. 2019. Brain activity regulates loose coupling between mitochondrial and cytosolic Ca²⁺ transients. *Nat Commun*. Nov 21;10(1):5277. doi: 10.1038/s41467-019-13142-0. PMID: 31754099; PMCID: PMC6872662.
- Linster, C. y T. A. Cleland. 2010. Decorrelation of Odor Representations via Spike Timing-Dependent Plasticity. *Front Comput Neurosci*. Dec 28;4:157. doi: 10.3389/fncom.2010.00157. PMID: 21228906; PMCID: PMC3016707.
- Mahan, V. L. 2019. Neurointegrity and neurophysiology: astrocyte, glutamate, and carbon monoxide interactions. *Med Gas Res*. Jan-Mar;9(1):24-45. doi: 10.4103/2045-9912.254639. PMID: 30950417; PMCID: PMC6463446.
- Mahmoud, S., M. Gharagozloo, C. Simard y D. Gris. 2019. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells*. Feb 20;8(2):184. doi: 10.3390/cells8020184. PMID: 30791579; PMCID: PMC6406900.
- Maksimova, M. A., H. L. Cansler, K. E. Zuk, J. M. Torres, D. J. Roberts J. P. Meeks. 2019. Interneuron Functional Diversity in the Mouse Accessory Olfactory Bulb. *eNeuro*. Aug 13;6(4):ENEURO.0058-19.2019. doi: 10.1523/ENEURO.0058-19.2019. PMID: 31358509; PMCID: PMC6712203.
- Mao, B. Q., F. Hamzei-Sichani, D. Aronov, R. C. Froemk y R. Yuste. 2001. Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron*. Dec 6;32(5):883-98. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00518-9. PMID: 11738033.
- Marbán, E. 2002. Cardiac channelopathies. *Nature*. Jan 10;415(6868):213-8. doi: 10.1038/415213a. PMID: 11805845.

- Markopoulos, F., D. Rokni, D. H. Gire y V. N. Murthy. 2012. Functional properties of cortical feedback projections to the olfactory bulb. *Neuron* 76:1175–88.
- Martín, R., R. Bajo-Grañeras, R. Moratalla, G. Perea y A. Araque. 2015. Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science*. 14;349(6249):730-4. doi: 10.1126/science.aaa7945.
- Martin-Fernandez M., S. Jamison, L. M. Robin, E. D. Martin, J. Aguilar, M. A. Benneyworth y A. Araque. 2017. Synapse-specific astrocyte gating of amygdala-related behavior. *Nat Neurosci*. 20(11):1540-1548. doi: 10.1038/nn.4649. Epub.
- Maslyukov, A., K. Li, X. Su, Y. Kovalchuk y O. Garaschuk. 2018. Spontaneous calcium transients in the immature adult-born neurons of the olfactory bulb. *Cell Calcium*. 2018 Sep;74:43-52. doi: 10.1016/j.ceca.2018.06.001. Epub 2018 Jun 6. PMID: 29890412.
- McDonough, P. M., N. L. Prigozhina, R. C. B. Basa y J. H. Price. 2017. Assay of Calcium Transients and Synapses in Rat Hippocampal Neurons by Kinetic Image Cytometry and High-Content Analysis: An In Vitro Model System for Postchemotherapy Cognitive Impairment. *Assay Drug Dev Technol*. Jul;15(5):220-236. doi: 10.1089/adt.2017.797. PMID: 28723268; PMCID: PMC5549836.
- Mederos S y G. Perea. 2019. GABAergic-astrocyte signaling: A refinement of inhibitory brain networks. *Glia*. Oct;67(10):1842-1851. doi: 10.1002/glia.23644. Epub May 30. PMID: 31145508; PMCID: PMC6772151.
- Merkle, F. T., L. C. Fuentealba, T. A. Sanders, L. Magno, N. Kessaris y A. Alvarez-Buylla. 2014. Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nat Neurosci*. 2014 Feb;17(2):207-14. doi: 10.1038/nn.3610. Epub 2013 Dec 22. PMID: 24362763; PMCID: PMC4100623.
- Merkle, F. T., Z. Mirzadeh, y A. Alvarez-Buylla. 2007. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317, 381–384. doi:10.1126/science.1144914
- Metaa, M. R. y E. A. Newman. 2006. Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *The Journal of neuroscience* 26, 2862- 2870.
- Miletta, M. C., V. Petkovic, A. Eblé, R. A. Ammann, C. E. Flück y P. E. Mullis. 2014. Butyrate increases intracellular calcium levels and enhances growth hormone release from rat anterior pituitary cells via the G-protein-coupled receptors GPR41 and 43. *PLoS One*. Oct 13;9(10):e107388. doi: 10.1371/journal.pone.0107388. PMID: 25310566; PMCID: PMC4195582.
- Minelli, A., P. Castaldo, P. Gobbi, S. Salucci, S. Magi y S. Amoroso. 2007. Cellular and subcellular localization of Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell Calcium*. Mar;41(3):221-34. doi: 10.1016/j.ceca.2006.06.004. Epub 2006 Aug 17. PMID: 16914199.
- Miragall, F., T. K. Hwang, O. Traub, E. L. Hertzberg y R. Dermietzel. 1992. Expression of connexins in the developing olfactory system of the mouse. *J Comp Neurol*. Nov 15;325(3):359-78. doi: 10.1002/cne.903250304. PMID: 1332989.

- Miyamoto, J., S. Hasegawa, M. Kasubuchi, A. Ichimura, A. Nakajima y I. Kimura. 2016. Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 450. <https://doi.org/10.3390/ijms17040450>.
- Mombaerts, P., F. Wang, C. Dulac, S. Chao, A. Nemes y M. Mendelsohn. 1996. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*. 87:675–86.
- Montiel-Herrera, M., D. García-Villa, G. López-Cervantes, K. Monge-Villegas y D. Reyes-Haro. 2019. The contribution of ion channels to modulate cerebral blood flow. Chapter 7. In: *Physiology and Pathology of Neuroglia*. Editor Reyes Haro D. eBook (en prensa).
- Montiel-Herrera, M., R. Miledi y J. García-Colunga. 2006. Membrane currents elicited by angiotensin II in astrocytes from the rat corpus callosum. *Glia*. 2006 Mar;53(4):366-71. doi: 10.1002/glia.20290. PMID: 16288466.
- Mori, K., K. Kishi y H. Ojima. 1983. Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 219, 339–355. doi:10.1002/cne.902190308.
- Müller, J., D. Reyes-Haro, T. Pivneva, C. Nolte, R. Schaette, J. Lübke y H. Kettenmann. 2009. The principal neurons of the medial nucleus of the trapezoid body and NG2(+) glial cells receive coordinated excitatory synaptic input. *The Journal of general physiology*, 134(2), 115–127. <https://doi.org/10.1085/jgp.200910194>.
- Murphy, G. J., D. P. Darcy y J. S. Isaacson. 2005. Intraglomerular inhibition: signaling mechanisms of an olfactory microcircuit. *Nat Neurosci.* 8:354–64.
- Nagayama, S., R. Homma y F. Imamura. 2014. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits*. Sep 3;8:98. doi: 10.3389/fncir.2014.00098. PMID: 25232305; PMCID: PMC4153298.
- Naik, A. S., J. M. Lin, E. Taroc, R. R. Katreddi, J. A. Frias, A. A. Lemus, M. A. Sammons y P. E. Forni. 2020. Smad4-dependent morphogenic signals control the maturation and axonal targeting of basal vomeronasal sensory neurons to the accessory olfactory bulb. *Development (Cambridge, England)*, 147(8), dev184036. <https://doi.org/10.1242/dev.184036>.
- Nett, W. J., S. H. Oloff y K. D. McCarthy. 2002. Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol.* Jan;87(1):528-37. doi: 10.1152/jn.00268.2001. PMID: 11784768.
- Nøhr, M. K., K. L. Egerod, S. H. Christiansen, A. Gille, S. Offermanns, T. W. Schwartz y M. Møller. 2015. Expression of the short chain fatty acid receptor GPR41/FFAR3 in autonomic and somatic sensory ganglia. *Neuroscience*. Apr 2;290:126-37. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.01.040. Epub 2015 Jan 28. PMID: 25637492.
- Nøhr, M. K., M. H. Pedersen, A. Gille, K. L. Egerod, M. S. Engelstoft, A. S. Husted, R. M. Sichlau, K. V. Grunddal, S. S. Poulsen, S. Han, R. M. Jones, S. Offermanns y T. W. Schwartz. 2013. GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. *Endocrinology*. Oct;154(10):3552-64. doi: 10.1210/en.2013-1142. Epub 2013 Jul 24. PMID: 23885020.

- Ona-Jodar, T., V. Lage-Rupprecht, N. M. Abraham, C. R. Rose y V. Egger. 2020. Local Postsynaptic Signaling on Slow Time Scales in Reciprocal Olfactory Bulb Granule Cell Spines Matches Asynchronous Release. *Front Synaptic Neurosci.* Nov 16;12:551691. doi: 10.3389/fnsyn.2020.551691. PMID: 33304264; PMCID: PMC7701096.
- Orellana, J. A. y J. Stehberg. 2014. Hemichannels: new roles in astroglial function. *Front Physiol.* Jun 17;5:193. doi: 10.3389/fphys.2014.00193. PMID: 24987373; PMCID: PMC4060415.
- Orona, E., J. W. Scott y E. C. Rainer. 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. doi:10.1002/cne.902170209.
- Ortuño-Sahagún, D., A. E. Rojas-Mayorquín, A. Camins y M. Pallàs. 2011. Embryonic neural stem cell differentiation to aldynoglia induced by olfactory ensheathing cell conditioned medium. *Embryonic stem cells: The hormonal regulation of pluripotency and embryogenesis*, Craig Atwood (Editor). Editorial In Tech. ISBN 978-953-307-196-1.
- Owsianik, G., K. Talavera, T. Voets y B. Nilius. 2006. Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol.* 68:685-717. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406. PMID: 16460288.
- Palygin, O., U. Lalo, A. Verkhratsky y Y. Pankratov. 2010. Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca²⁺ signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium.* Oct;48(4):225-31. doi: 10.1016/j.ceca.2010.09.004. PMID: 20926134.
- Panzanelli, P., A. Z. Perazzini, J. M. Fritschy y M. Sassoè-Pognetto. 2005. Heterogeneity of gamma-aminobutyric acid type A receptors in mitral and tufted cells of the rat main olfactory bulb. *J Comp Neurol.* Mar 28;484(1):121-31. doi: 10.1002/cne.20440. PMID: 15717305.
- Park, B. Y. y J. P. Saint-Jeannet. 2010. *Induction And Segregation Of The Vertebrate Cranial Placodes*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Publishers. Disponible en; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53175/pdf/TOC.pdf>.
- Parpura, V., V. Grubišić y A. Verkhratsky. 2011. Ca²⁺ sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes. *Biochim Biophys Acta.* May;1813(5):984-91. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.11.006. Epub 2010 Nov 27. PMID: 21118669.
- Parri, H. R., T. M. Gould y V. Crunelli. 2001. Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci.* Aug;4(8):803-12. doi: 10.1038/90507. PMID: 11477426.
- Parry, H., A. McDougall y M. Whitaker. 2006. Endoplasmic reticulum generates calcium signalling microdomains around the nucleus and spindle in syncytial *Drosophila* embryos. *Biochem Soc Trans.* Jun;34(Pt 3):385-8. doi: 10.1042/BST0340385. PMID: 16709168.
- Paxinos, G. y C. Watson. 2018. “Paxinos and Watson’s The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Compact. 7th edition”. Elsevier Academic Press, San Diego.

- Pellerin, L. y P. J. Magistretti. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10625-10629.
- Peppiatt, C. M., T. J. Collins, L. Mackenzie, S. J. Conway, A.B. Holmes, M. D. Bootman, M. J. Berridge, J. T. Seo y H. L. Roderick. 2003. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. *Cell Calcium*. 2003 Jul;34(1):97-108. doi: 10.1016/s0143-4160(03)00026-5. PMID: 12767897.
- Perea, G. y A. Araque. 2007. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*. Aug 24;317(5841):1083-6. doi: 10.1126/science.1144640. PMID: 17717185.
- Perea, G. y A. Araque. 2010. GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev*. May;63(1-2):93-102. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.10.005. Epub 2009 Nov 6. PMID: 19896978.
- Perez, E. J., S. A. Tapanes, Z. B. Loris, D. T. Balu, T. J. Sick, J. T. Coyle y D. J. Liebl. 2017. Enhanced astrocytic d-serine underlies synaptic damage after traumatic brain injury. *J Clin Invest*. 2017 Aug 1;127(8):3114-3125. doi: 10.1172/JCI92300. Epub Jul 17. PMID: 28714867; PMCID: PMC5531405.
- Petreaanu, L. y A. Alvarez-Buylla. 2002. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J. Neurosci*. 22, 6106–6113.
- Prakriya, M. y R. S. Lewis. 2015. Store-Operated Calcium Channels. *Physiological reviews*, 95(4), 1383–1436. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2014>.
- Price, J. L. y T. P. S Powell. 1970. The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *J. Cell Sci*. 7, 631-651.
- Reyes, R. C. y V. Parpura. 2008. Mitochondria modulate Ca²⁺-dependent glutamate release from rat cortical astrocytes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(39), 9682–9691. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3484-08.2008>.
- Reyes-Haro, D., J. Müller, M. Boresch, T. Pivneva, B. Benedetti, A. Scheller, C. Nolte y H. Kettenmann. 2010. Neuron-astrocyte interactions in the medial nucleus of the trapezoid body. *J Gen Physiol*. Jun;135(6):583-94. doi: 10.1085/jgp.200910354. Epub May 17. PMID: 20479112; PMCID: PMC2888059.
- Ribeiro, M. A. y P. F. Costa. 2000. Kinetic parameters of calcium currents in maturing acutely isolated CA1 cells. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000 Nov 30;124(1-2):11-23. doi: 10.1016/s0165-3806(00)00099-7. PMID: 11113507.
- Rizzuto, R., D. De Stefani, A. Raffaello y C. Mammucari. 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Sep;13(9):566-78. doi: 10.1038/nrm3412. Epub 2012 Aug 1. PMID: 22850819.

- Rodríguez-Prados, M. 2017. Dinámica del calcio reticular en astrocitos corticales. Tesis de Doctorado. Universidad de Valladolid. Escuela de Doctorado Universidad de Valladolid. Valladolid, España.
- Rodríguez-Prados, M., J. Rojo-Ruiz, J. García-Sancho y M. T. Alonso. 2020. Direct monitoring of ER Ca²⁺ dynamics reveals that Ca²⁺ entry induces ER-Ca²⁺ release in astrocytes. *Pflugers Arch.* 2020 Apr;472(4):439-448. doi: 10.1007/s00424-020-02364-7. Epub Apr 3. PMID: 32246199.
- Rose, C. R., D. Ziemens y A. Verkhratsky. 2020. On the special role of NCX in astrocytes: Translating Na⁺-transients into intracellular Ca²⁺ signals. *Cell Calcium.* Mar;86:102154. doi: 10.1016/j.ceca.2019.102154. Epub 2019 Dec 23. PMID: 31901681.
- Rotermund, N., K. Schulz, D. Hirnet y C. Lohr. 2019. Purinergic Signaling in the Vertebrate Olfactory System. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 112. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00112>
- Rotermund, N., S. Winandy, T. Fischer, K. Schulz, T. Fregin, N. Alstedt, M. Buchta, J. Bartels, M. Carlström, C. Lohr y D. Hirnet. 2018. Adenosine A1 receptor activates background potassium channels and modulates information processing in olfactory bulb mitral cells. *J Physiol.* Feb 15;596(4):717-733. doi: 10.1113/JP275503. Epub 2018 Jan 24. PMID: 29274133; PMCID: PMC5813606.
- Rui, Y., S. L. Pollitt, K. R. Myers, Y. Feng y J. Q. Zheng. 2020. Spontaneous Local Calcium Transients Regulate Oligodendrocyte Development in Culture through Store-Operated Ca²⁺ Entry and Release. *eNeuro.* 2020 Aug 17;7(4):ENEURO.0347-19.2020. doi: 10.1523/ENEURO.0347-19.2020. PMID: 32409508; PMCID: PMC7438061.
- Sadler, T. J. 2010. Langman embriología médica con orientación clínica. 10ª edición. Lippincott & Wilkins, Inc. USA.
- Sakaguchi, H., Y. Ozaki, T. Ashida, T. Matsubara, N. Oishi, S. Kihara y J. Takahashi. 2019. Self-Organized Synchronous Calcium Transients in a Cultured Human Neural Network Derived from Cerebral Organoids. *Stem Cell Reports.* Sep 10;13(3):458-473. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.05.029. Epub 2019 Jun 27. PMID: 31257131; PMCID: PMC6739638.
- Sandini, T. M., W. N. Marks, N. B. Tahir, Y. Song, Q. Greba J. G. Howland. 2020. NMDA Receptors in Visual and Olfactory Sensory Integration in Male Long Evans Rats: A Role for the Orbitofrontal Cortex. *Neuroscience.* Aug 1;440:230-238. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.05.041. Epub 2020 Jun 1. PMID: 32497759.
- Savtchouk, I. y A. Volterra. 2018. Gliotransmission: Beyond Black-and-White. *J Neurosci.* Jan 3;38(1):14-25. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0017-17.2017. PMID: 29298905; PMCID: PMC6705815.
- Scemes, E. y C. Giaume. 2006. Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia.* Nov 15;54(7):716-25. doi: 10.1002/glia.20374. PMID: 17006900; PMCID: PMC2605018.

- Schlegel, P., A. S. Bates, T. Stürner, S. R. Jagannathan, N. Drummond, J. Hsu, L. Serratos-Capdevila, A. Javier, E. C. Marin, A. Barth-Maron, I. F. Tamimi, F. Li, G. M. Rubin, S. M. Plaza, M. Costa y G. S. X. E Jefferis. 2021. Information flow, cell types and stereotypy in a full olfactory connectome. *Elife*. 2021 May 25;10:e66018. doi: 10.7554/eLife.66018. PMID: 34032214; PMCID: PMC8298098.
- Schousboe, A. 2003. Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem. Res.* 28, 347–352. doi:10.1023/A:1022397704922.
- Schulz, K., N. Rotermund, K. Grzelka, J. Benz, C. Lohr y D. Hirnet. 2018. Adenosine A1 Receptor-Mediated Attenuation of Reciprocal Dendro-Dendritic Inhibition in the Mouse Olfactory Bulb. *Front Cell Neurosci.* Jan 15;11:435. doi: 10.3389/fncel.2017.00435. PMID: 29379418; PMCID: PMC5775233.
- Serrano, A., N. Haddjeri, J. C. Lacaille y R. Robitaille. 2006. GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J Neurosci.* May 17;26(20):5370-82. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5255-05.2006. PMID: 16707789; PMCID: PMC6675310.
- Shepherd, G. M., C. A. Greer, P. Mazzarello y M. Sassoe-Pognetto. 2011. The first images of nerve cells: Golgi on the olfactory bulb 1875. *Brain Res Rev.* 66:92–105.
- Sherwood, M. W., M. Arizono, A. Panatier, K. Mikoshiba y S. H. R. Oliet. 2021. Astrocytic IP₃Rs: Beyond IP₃R2. *Front Cell Neurosci.* 2021 Jul 30;15:695817. doi: 10.3389/fncel.2021.695817. PMID: 34393726; PMCID: PMC8363081.
- Shiau, C. E., R. M. Das y K. G. Storey. 2011. An effective assay for high cellular resolution time-lapse imaging of sensory placode formation and morphogenesis. *BMC Neurosci.* May 9;12:37. doi: 10.1186/1471-2202-12-37. PMID: 21554727; PMCID: PMC3115907.
- Shigetomi, E., O. Jackson-Weaver, R. T. Huckstepp, T. J. O'Dell y B. S. Khakh. 2013. TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. *J Neurosci.* Jun 12;33(24):10143-53. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5779-12.2013. PMID: 23761909; PMCID: PMC3682388.
- Shioda, N., y K. Fukunaga. 2017. Physiological and Pathological Roles of CaMKII-PP1 Signaling in the Brain. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 20. <https://doi.org/10.3390/ijms19010020>.
- Shpak, G., A. Zylbental y S. Wagner. 2015. Transient and sustained afterdepolarizations in accessory olfactory bulb mitral cells are mediated by distinct mechanisms that are differentially regulated by neuromodulators. *Front Cell Neurosci.* Jan 14;8:432. doi: 10.3389/fncel.2014.00432. PMID: 25642164; PMCID: PMC4294165.
- Shusterman, R., M. C. Smear, A. A. Koulakov y D. Rinberg. 2011. Precise olfactory responses tile the sniff cycle. *Nat Neurosci.* Jul 17;14(8):1039-44. doi: 10.1038/nn.2877. PMID: 21765422.

- Simard, M. y M. Nedergaard. 2004. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*. 2004;129(4):877-96. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.09.053. PMID: 15561405.
- Soboloff, J., B. S. Rothberg, M. Madesh y D. L. Gill. 2012. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **13**, 549–65.
- Soucy, E. R., D. F. Albeanu, A. L. Fantana, V. N. Murthy y M. Meister. 2009. Precision and diversity in an odor map on the olfactory bulb. *Nat Neurosci*. Feb;12(2):210-20. doi: 10.1038/nn.2262. Epub Jan 18. PMID: 19151709.
- Spitzer, N. C., E. Olson y X. Gu. 1995. Spontaneous calcium transients regulate neuronal plasticity in developing neurons. *J Neurobiol*. Mar;26(3):316-24. doi: 10.1002/neu.480260304. PMID: 7775965.
- Spruston, N. 2008. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci* 9, 206–221 (2008). <https://doi.org/10.1038/nrn2286>.
- Stavermann, M., P. Meuth, M. Doengi, A. Thyssen, J. W. Deitmer y C. Lohr. 2015. Calcium-induced calcium release and gap junctions mediate large-scale calcium waves in olfactory ensheathing cells *in situ*. *Cell Calcium*, 58(2), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.05.003>.
- Stobart, J. L., K. D. Ferrari, M. J. P. Barrett, C. Glück, M. J. Stobart, M. Zuend y B. Weber. 2018. Cortical Circuit Activity Evokes Rapid Astrocyte Calcium Signals on a Similar Timescale to Neurons. *Neuron*. 98(4):726-735.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2018.03.050.
- Stroh, O., M. Freichel, O. Kretz, L. Birnbaumer, J. Hartmann y V. Egger. 2012. NMDA receptor-dependent synaptic activation of TRPC channels in olfactory bulb granule cells. *J Neurosci*. Apr 25;32(17):5737-46. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3753-11.2012. PMID: 22539836; PMCID: PMC3349057.
- Stuart, G.J. y B. Sakmann. 1994. Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature*. Jan 6;367(6458):69-72. doi: 10.1038/367069a0. PMID: 8107777.
- Sun, Z. H., Y. L. Lai, W. W. Zeng, D. Zhao, H. C. Zuo y Z. P. Xie. 2003. Neural stem/progenitor cells survive and differentiate better in PD rats than in normal rats. *Acta Neurochirurgica Supplementum* 87: 169-174
- Swayne, L. A. y S. A. Bennett. 2016. Connexins and pannexins in neuronal development and adult neurogenesis. *BMC Cell Biol*. May 24;17 Suppl 1(Suppl 1):10. doi: 10.1186/s12860-016-0089-5. PMID: 27230672; PMCID: PMC4896249.
- Szymański, J., J. Janikiewicz, B. Michalska, P. Patalas-Krawczyk, M. Perrone, W. Ziółkowski, J. Duszyński, P. Pinton, A. Dobrzyń y M. R. Więckowski. 2017. Interaction of Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane in Calcium Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure. *Int J Mol Sci*. Jul 20;18(7):1576. doi: 10.3390/ijms18071576. PMID: 28726733; PMCID: PMC5536064.

- Tang, F., E.W. Dent y K. Kalil. 2003. Spontaneous calcium transients in developing cortical neurons regulate axon outgrowth. *J Neurosci.* Feb 1;23(3):927-36. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-03-00927.2003. PMID: 12574421; PMCID: PMC6741922.
- Tatti, R., K. Bhaukaurally, O. Gschwend, R. P. Seal, R. H. Edwards, I. Rodriguez y A. Carleton. 2014. A population of glomerular glutamatergic neurons controls sensory information transfer in the mouse olfactory bulb. *Nat Commun.* May 7;5:3791. doi: 10.1038/ncomms4791. PMID: 24804702; PMCID: PMC4028618.
- Temple, B. R. y A. M. Jones. 2007. The plant heterotrimeric G-protein complex. *Annu Rev Plant Biol.* 58:249-66. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103827. PMID: 17201690.
- Torres-Fernández, O. 2006. La técnica de impregnación argéntica de Golgi. Conmemoración del centenario del premio nobel de Medicina (1906) compartido por Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal. *Biomédica.* 26:498-508.
- Tower, D. B. y O. M. Young. 1973. The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. *J Neurochem.* Feb;20(2):269-78. doi: 10.1111/j.1471-4159.1973.tb12126.x. PMID: 4633361.
- Ung, K., B. Tepe, B. Pekarek, B. R. Arenkiel y B. Deneen. 2020. Parallel astrocyte calcium signaling modulates olfactory bulb responses. *J Neurosci Res.* Aug;98(8):1605-1618. doi: 10.1002/jnr.24634. Epub May 19. PMID: 32426930; PMCID: PMC8147697.
- Vaaga, C. E., J. T. Yorgason, J. T. Williams y G. L. Westbrook. 2017. Presynaptic gain control by endogenous cotransmission of dopamine and GABA in the olfactory bulb. *J Neurophysiol.* Mar 1;117(3):1163-1170. doi: 10.1152/jn.00694.2016. Epub 2016 Dec 28. PMID: 28031402; PMCID: PMC5340883.
- Vandecaetsbeek, I., P. Vangheluwe, L. Raeymaekers, F. Wuytack y J. Vanoevelen. 2011. The Ca²⁺ pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* May 1;3(5):a004184. doi: 10.1101/cshperspect.a004184. PMID: 21441596; PMCID: PMC3101839.
- Van-Den-Pol, A. N., K. Obrietan y A. Belousov. 1996. Glutamate hyperexcitability and seizure-like activity throughout the brain and spinal cord upon relief from chronic glutamate receptor blockade in culture. *Neuroscience.* Oct;74(3):653-74. doi: 10.1016/0306-4522(96)00153-4. PMID: 8884763.
- Van-Horn, M. R., M. Sild y E. S. Ruthazer. 2013. D-serine as a gliotransmitter and its roles in brain development and disease. *Front Cell Neurosci.* Apr 23;7:39. doi: 10.3389/fncel.2013.00039. PMID: 23630460; PMCID: PMC3632749.
- Verkhatsky, A. y M. Nedergaard. 2018 Physiology of Astroglia. *Physiol Rev.* Jan 1;98(1):239-389. doi: 10.1152/physrev.00042.2016. PMID: 29351512; PMCID: PMC6050349.
- Verkhatsky, A. y V. Parpura. 2014. Introduction to Neuroglia 14-15 p. Colloquium Series on Neuroglia in Biology and Medicine: From Physiology to Disease. Biota Publishing.

- Verkhatsky, A., J. J. Rodríguez y V. Parpura. 2013a. Astroglia in neurological diseases. *Future Neurol.* Mar 1;8(2):149-158. doi: 10.2217/fnl.12.90. PMID: 23658503; PMCID: PMC3645493.
- Verkhatsky, A., M. Noda, V. Parpura y S. Kirischuk. 2013b. Sodium fluxes and astroglial function. *Adv Exp Med Biol.* 961:295-305. doi: 10.1007/978-1-4614-4756-6_25. PMID: 23224889.
- Verkhatsky, A., M. Trebak, F. Perocchi, D. Khananshvili y I. Sekler. 2018. Crosslink between calcium and sodium signalling. *Exp Physiol.* Feb 1;103(2):157-169. doi: 10.1113/EP086534. Epub 2018 Jan 16. PMID: 29210126; PMCID: PMC6813793.
- Verkhatsky, A., O. A. Krishtal y G. Burnstock. 2009. Purinoceptors on neuroglia. *Mol Neurobiol.* 2009 Jun;39(3):190-208. doi: 10.1007/s12035-009-8063-2. Epub Mar 13. Erratum in: *Mol Neurobiol.* 2009 Jun;39(3):209. Verkhatsky, Alexei [corrected to Verkhatsky, Alexei]. PMID: 19283516.
- Verkhatsky, A., R. K. Orkand y H. Kettenmann. 1998. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev.* Jan;78(1):99-141. doi: 10.1152/physrev.1998.78.1.99. PMID: 9457170.
- Walters, M. C., M. J. Sonner, J. H. Myers y D. R. Ladle. 2019. Calcium Imaging of Parvalbumin Neurons in the Dorsal Root Ganglia. *eNeuro.* Aug 1;6(4):ENEURO.0349-18.2019. doi: 10.1523/ENEURO.0349-18.2019. PMID: 31311802; PMCID: PMC6709205.
- Wenzel, A., J. M. Fritschy, H. Mohler y D. Benke. 1997. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem.* Feb;68(2):469-78. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68020469.x. PMID: 9003031.
- Whitesell, J. D., K. A. Sorensen, B. C. Jarvie, S. T. Hentges y N. E. Schoppa. 2013. Interglomerular lateral inhibition targeted on external tufted cells in the olfactory bulb. *JNeurosci* 2013;33:1552–63.
- Wu, J., Z. Zhou, Y. Hu y S. Dong. 2012. Butyrate-induced GPR41 activation inhibits histone acetylation and cell growth. *J Genet Genomics.* Aug 20;39(8):375-84. doi: 10.1016/j.jgg.2012.05.008. Epub 2012 Jul 13. PMID: 22884094.
- Wu, Y. W., S. Gordleeva, X. Tang, P. Y. Shih, Y. Dembitskaya y A. Semyanov. 2019. Morphological profile determines the frequency of spontaneous calcium events in astrocytic processes. *Glia.* Feb;67(2):246-262. doi: 10.1002/glia.23537. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30565755.
- Wu, Y. W., X. Tang, M. Arizono, H. Bannai, P. Y. Shih, Y. Dembitskaya, V. Kazantsev, M. Tanaka, S. Itohara, K. Mikoshiba y A. Semyanov. 2014. Spatiotemporal calcium dynamics in single astrocytes and its modulation by neuronal activity. *Cell Calcium.* Feb;55(2):119-29. doi: 10.1016/j.ceca.2013.12.006. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24484772.
- Xu, H. L., L. Mao, S. Ye, C. Paisansathan, F. Vetri y D. A. Pelligrino. 2007. Astrocytes are a key conduit for upstream signaling of vasodilation during cerebral cortical neuronal activation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Feb;294(2):H622-32. doi: 10.1152/ajpheart.00530.2007. Epub Nov 30. PMID: 18055520.

- Yaguchi, T. y T. Nishizaki. 2010. Extracellular high K⁺ stimulates vesicular glutamate release from astrocytes by activating voltage-dependent calcium channels. *J Cell Physiol.* Nov;225(2):512-8. doi: 10.1002/jcp.22231. PMID: 20506270.
- Yamada, S., T. Yamamoto y Y. Tonomura. 1970. Reaction mechanism of the Ca²⁺ plus-dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. 3. Ca plus-uptake and ATP-splitting. *J Biochem.* Jun;67(6):789-94. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129310. PMID: 4247349.
- Yamashita, M. 2008. Synchronous Ca(2+) oscillation emerges from voltage fluctuations of Ca(2+) stores. *FEBS J.* 2008 Aug;275(16):4022-32. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06543.x. Epub 2008 Jul 4. PMID: 18616469.
- Zaqout, S. y A.M. Kaindl. 2016. Golgi-Cox Staining Step by Step. *Frontiers in neuroanatomy*, 10, 38. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00038>.
- Zeiter, S. 2017. Molecular Identification of Voltage-dependent Potassium Channels in the Diabetic Brain. Tesis de licenciatura. University of Applied Sciences and Arts Northwestern Switzerland. School of Life Sciences. Suiza.
- Zeppilli, S., T. Ackels, R. Attey, N. Klimpert, K. D. Ritola, S. Boeing, A. Crombach, A. T. Schaefer y A. Fleischmann. 2021. Molecular characterization of projection neuron subtypes in the mouse olfactory bulb. *Elife.* 2021 Jul 22;10:e65445. doi: 10.7554/eLife.65445. PMID: 34292150; PMCID: PMC8352594.
- Zhou, Z., N. Xu, N. Matei, D. W. McBride, Y. Ding, H. Liang, J. Tang y J. H. Zhang. 2021. Sodium butyrate attenuated neuronal apoptosis via GPR41/Gβγ/PI3K/Akt pathway after MCAO in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* Feb;41(2):267-281. doi: 10.1177/0271678X20910533. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32151222.
- Zonta, M., M. C. Angulo, S. Gobbo, B. Rosengarten, K. A. Hossmann, T. Pozzan y G. Carmignoto. 2003 Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* 6, 43–50. doi:10.1038/nn980.