

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y
PARASITOLOGÍA

ANÁLISIS DE LAS DIANAS DE LA ACCIÓN DEL ÓXIDO
NÍTRICO COMO NEUROMODULADOR EN EL BULBO
OLFATORIO DE LA RATA

MARÍA GUTIÉRREZ MECINAS

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 26 de Març de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Carlos López García
- D. José Ramón Alonso Peña
- D. Eduardo Werruaga Prieto
- D^a. Laura López Mascaraque
- D. José Miguel Blasco Ibáñez

Va ser dirigida per:

D. Carlos Crespo Rupérez

D. José Francisco Martínez Guijarro

©Copyright: Servei de Publicacions
María Gutiérrez Mecinas

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7076-6

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT  VALÈNCIA

FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I PARASITOLOGIA



**ANÁLISIS DE LAS DIANAS DE LA
ACCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO COMO
NEUROMODULADOR EN EL BULBO
OLFATORIO DE LA RATA**

MEMORIA PRESENTADA POR

MARÍA GUTIÉRREZ MECINAS

PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR

**ANÁLISIS DE LAS DIANAS DE LA
ACCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO COMO
NEUROMODULADOR EN EL BULBO
OLFATORIO DE LA RATA**

María Gutiérrez Mecinas

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar debo agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia que me concediera una beca de formación de profesorado universitario para realizar esta tesis doctoral, sin la cual igual no hubiera sido posible llevarla a cabo.

Además, en este apartado quiero dar las gracias a toda la gente que durante este tiempo siempre ha estado aquí para echar una mano. Al principio Javi y Anabel en el laboratorio; a José Miguel, siempre dando consejos para optimizar el trabajo y obtener los mejores resultados; a Emilio, con ese toque de humor ácido; a Juan, Ester, M^a Ángeles y Ramón; a mis directores Paco Pepe y Carlos, por haberme enseñado como realizar un trabajo de investigación. Agradecer sobre todo a Carlos el haberme abierto las puertas de este agri dulce mundo que es la investigación, por haber estado ahí en todos los momentos en que he necesitado su consejo y por haberme dado ánimo en los momentos de crisis.

Como no, también quería agradecer a mis padres que me obligasen a estudiar el primer año de Biología, porque de lo contrario no creo que hubiera llegado hasta aquí. Y por supuesto, agradecerle a Juan Carlos el haber estado ahí siempre, teniendo una paciencia infinita conmigo, el haberme apoyado siempre en todo momento y por alentarme a seguir en este mundo.

Por último, no podía olvidarme de dar las gracias a las personas que me han acogido con los brazos abiertos en sus laboratorios cuando he realizado las estancias cortas: el Dr. J. Paul Bolam (Universidad de Oxford, Reino Unido), el Dr. José Ángel Martínez Menárguez (Universidad de Murcia, España) y el Dr. Phil Heyward (Universidad de Otago, Nueva Zelanda), y a las personas con las que estuve trabajando y conviviendo [Justin, Juan, Ignelia, Pablo y Daniela (Oxford), Emma e Irene (Murcia) y Emma, Charlotte y Christine (Dunedin)]

A todos ellos, y a quien me haya podido dejar por el camino, muchas gracias.

ÍNDICE

2. INTRODUCCIÓN	1
2.1. Bulbo Olfatorio: organización y función	2
2.1.1. <u>Capa del nervio olfatorio</u>	4
2.1.2. <u>Capa de los glomérulos olfatorios</u>	4
2.1.2.1. Tipos celulares	4
2.1.2.1.1. <i>Células periglomerulares</i>	4
2.1.2.1.2. <i>Células empenachadas externas</i>	6
2.1.2.1.3. <i>Células superficiales de axón corto</i>	7
2.1.2.2. Organización del neuropilo en el interior glomerular	8
2.1.2.3. Caracterización neuroquímica de las células periglomerulares	10
2.1.3. <u>Capa plexiforme externa</u>	11
2.1.3.1. Tipos celulares	12
2.1.3.1.1. <i>Células empenachadas</i>	12
2.1.3.1.2. <i>Interneuronas de la capa plexiforme externa</i>	13
2.1.3.2. Organización del neuropilo	14
2.1.4. <u>Capa de las células mitrales</u>	14
2.1.5. <u>Capa plexiforme interna</u>	16
2.1.6. <u>Capa de las células granulares</u>	16
2.1.6.1. Tipos celulares	16
2.1.6.1.1. <i>Células granulares</i>	16
2.1.6.1.2. <i>Células profundas de axón corto</i>	17
2.1.6.2. Organización del neuropilo	19
2.1.7. <u>Capa de la sustancia blanca</u>	19
2.2. Óxido nítrico	20
2.2.1. <u>Producción del óxido nítrico</u>	21
2.2.2. <u>Vías de actuación del óxido nítrico en el cerebro</u>	23
2.2.2.1. Vía de la activación de la guanilato ciclasa soluble	23
2.2.2.1.1. <i>Canales iónicos activados por la unión de nucleótidos cíclicos</i>	25
2.2.2.1.2. <i>Proteínas kinasas dependientes de GMPc</i>	28
2.2.2.1.3. <i>Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos</i>	29
2.2.2.2. Vía de la nitrosilación de proteínas	31
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
4. MATERIAL Y MÉTODOS	39
4.1. Animales de experimentación	40
4.2. Anticuerpos	40
4.3. Tampones	42
4.4. Equipos utilizados	42
4.4.1. <u>Microtomía</u>	42

4.4.2. <u>Microscopía</u>	43
4.4.3. <u>Sistemas de captura de imagen</u>	43
4.4.4. <u>Programas de modificación-procesado de la imagen</u>	43
4.5. <u>Perfusión. Obtención de las secciones flotantes</u>	43
4.6. <u>Tinciones con azul de toluidina</u>	44
4.6.1. <u>Tinción de Nissl en cortes de vibratomo</u>	45
4.6.2. <u>Tinción de cortes semifinos con azul de toluidina-borax</u>	45
4.7. <u>Detección histoquímica de la NADPH-diaforasa</u>	45
4.8. <u>Técnicas inmunocitoquímicas</u>	46
4.8.1. <u>Marcajes inmunocitoquímicos simples</u>	47
4.8.1.1. <i>Marcajes inmunocitoquímicos simples en preinclusión</i>	47
4.8.1.1.1. <i>Marcaje inmunocitoquímico simple mediante el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC)</i>	47
4.8.1.1.1.1. <u>Cuando el estudio queda restringido a la microscopía óptica convencional</u>	48
4.8.1.1.1.2. <u>Cuando el estudio implica un posterior análisis con microscopía electrónica de transmisión</u>	48
4.8.1.1.2. <i>Marcaje inmunocitoquímico simple utilizando oro coloidal</i>	49
4.8.1.1.3. <i>Marcaje inmunocitoquímico simple mediante fluorescencia</i>	50
4.8.1.2. <i>Marcaje inmunocitoquímico simple en postinclusión sobre secciones semifinas</i>	51
4.8.2. <u>Marcajes inmunocitoquímicos dobles</u>	52
4.8.2.1. <i>Marcaje inmunocitoquímico doble con ABC y oro coloidal en preinclusión</i> ... 52	
4.8.2.1.1. <i>Dobles marcajes cuando los anticuerpos son de distinto origen</i>	52
4.8.2.1.2. <i>Dobles marcajes cuando los anticuerpos son del mismo origen</i>	53
4.8.2.2. <i>Marcaje inmunohistoquímico doble con ABC en preinclusión y oro coloidal en postinclusión</i>	54
4.8.2.3. <i>Marcaje inmunohistoquímico doble con partículas de oro coloidal de amplificado en preinclusión y con partículas de oro coloidal de un tamaño determinado en postinclusión</i>	55
4.8.2.4. <i>Marcaje inmunohistoquímico doble con DAB y DAB-Ni en preinclusión</i>	55
4.8.2.5. <i>Marcaje inmunohistoquímico doble con fluorescencia</i>	56
4.8.2.6. <i>Marcaje inmunohistoquímico doble con fluorescencia con anticuerpos primarios del mismo origen mediante el empleo de los fragmentos F(ab)</i>	57
4.9. <u>Ultramicrotomía</u>	57
4.10. <u>Crioultramicrotomía</u>	58
4.10.1. <u>Obtención de secciones semifinas mediante la técnica de crioultramicrotomía</u>	59
4.10.2. <u>Doble detección inmunohistoquímica en secciones semifinas adyacentes de tejido obtenidas por crioultramicrotomía</u>	59

5. RESULTADOS	61
5.1. Producción del óxido nítrico	62
5.1.1. <u>Relaciones sinápticas de las PG1-nNOS en el interior del neuropilo glomerular</u>	62
5.2. <u>Vía de actuación del óxido nítrico: activación de la enzima guanilato ciclasa soluble y la producción de GMPc</u>	63
5.2.1. <u>Descripción de la distribución de la enzima guanilato ciclasa soluble</u>	63
5.2.1.1. <i>Distribución de la guanilato ciclasa soluble y caracterización de las células que contienen esta enzima en el bulbo olfatorio principal</i>	64
5.2.1.1.1. <i>Caracterización de las células que expresan guanilato ciclasa soluble en la capa de los glomérulos olfatorios</i>	64
5.2.1.1.2. <i>Caracterización de las células que expresan guanilato ciclasa soluble en la capa plexiforme externa</i>	65
5.2.1.1.3. <i>Caracterización de las células que expresan guanilato ciclasa soluble en la capa de las células mitrales y en la capa plexiforme interna</i>	66
5.2.1.1.4. <i>Caracterización de las células que expresan guanilato ciclasa soluble en la capa de las células granulares</i>	67
5.2.1.2. <i>Distribución de la guanilato ciclasa soluble y caracterización de las células que contienen esta enzima en la corriente migratoria rostral</i>	68
5.2.2. <u>Análisis de las posibles vías de transducción del GMPc</u>	68
5.2.2.1. <i>Vía de los canales iónicos activados por la unión de nucleótidos cíclicos</i>	69
5.2.2.1.1. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad A2 de los CNG en el bulbo olfatorio principal</i>	69
5.2.2.1.2. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad A2 de los CNG en la corriente migratoria rostral</i>	70
5.2.2.1.3. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad A3 de los CNG en el bulbo olfatorio principal</i>	71
5.2.2.1.4. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad A3 de los CNG en la corriente migratoria rostral</i>	74
5.2.2.1.5. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad 1 de los HCN en el bulbo olfatorio principal</i>	75
5.2.2.1.6. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad 1 de los HCN en la corriente migratoria rostral</i>	76
5.2.2.1.7. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad 2 de los HCN en el bulbo olfatorio principal</i>	76
5.2.2.1.8. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad 2 de los HCN en la corriente migratoria rostral</i>	78
5.2.2.1.9. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad 4 de los HCN en el bulbo olfatorio principal</i>	78
5.2.2.1.10. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad 4 de los HCN en la corriente migratoria rostral</i>	79

5.2.2.2. Vía de las proteínas kinasas dependientes de GMPc	79
5.2.2.2.1. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen la isoforma β de la PKG1 en el bulbo olfatorio principal</i>	80
5.2.2.2.2. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen la isoforma β de la PKG1 en la corriente migratoria rostral</i>	81
5.2.2.2.3. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen PKG2 en el bulbo olfatorio principal</i>	82
5.2.2.2.4. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen PKG2 en la corriente migratoria rostral</i>	82
5.2.2.3. Vía de las fosfodiesterasas de los nucleótidos cíclicos	82
5.2.2.3.1. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen la PDE5 en el bulbo olfatorio principal</i>	82
5.2.2.3.2. <i>Distribución y caracterización de las células que contienen PDE5 en la corriente migratoria rostral</i>	84
5.3. Vía de actuación del óxido nítrico mediante la nitrosilación de proteínas	84
5.4. Relación del óxido nítrico con el sistema de transmisión dopaminérgico	84
FIGURAS	89
6. DISCUSIÓN	181
6.1. Análisis de las vías de actuación del óxido nítrico en el bulbo olfatorio principal	182
6.1.1. <u>Distribución y localización de la nNOS en las interneuronas</u>	182
6.1.2. <u>Presencia de la enzima GCs en el bulbo olfatorio principal</u>	184
6.1.2.1 Presencia de la enzima GCs en la capa de los glomérulos olfatorios	184
6.1.2.2 Presencia de la enzima GCs en la región inframitral	185
6.1.2.3. Relación existente entre óxido nítrico, GCs y CB	186
6.1.3. <u>Vías de señalización intracelular del GMPc en las células que expresan GCs</u>	187
6.1.3.1. Vías de señalización del GMPc en las células periglomerulares que expresan GCs	188
6.1.3.2. Vía de señalización del GMPc en las células profundas de axón corto	191
6.1.4. <u>Análisis de las distintas vías de transducción del GMPc</u>	191
6.1.4.1. Distribución general de los CNG	191
6.1.4.1.1. <u>Distribución general de CNGA2</u>	192
6.1.4.1.2. <u>Distribución general de CNGA3</u>	193
6.1.4.1.2.1. <u>Expresión de CNGA3 en glía envolvente</u>	193
6.1.4.1.2.2. <u>Expresión de CNGA3 en neuronas maduras</u>	194
6.1.4.1.3. <u>Distribución general de los HCN</u>	196
6.1.4.2. Distribución general de las PKG	196
6.1.4.2.1. <u>Distribución general de PKG1β</u>	197
6.1.4.2.2. <u>Distribución general de PKG2</u>	198

6.1.4.3. Distribución general de PDE5	198
6.1.5. <u>Vía de la S-nitrosilación de proteínas</u>	198
6.1.6. <u>Relación de los sistemas nitrérgico y dopaminérgico en los glomérulos olfatorios</u>	199
6.1.6.1. Modulación de la transmisión dopaminérgica: actuación sobre las células productoras de dopamina	200
6.1.6.2 Modulación de la transmisión dopaminérgica: actuación directa sobre la dopamina	201
6.1.6.3 Modulación de la transmisión dopaminérgica: actuación sobre las dianas de actuación de la dopamina	201
6.1.6.3.1. <i>Receptor D2 de dopamina en los terminales axónicos del nervio olfatorio</i>	201
6.1.6.3.2. <i>Receptor D2 de dopamina en las células principales</i>	202
6.1.6.3.3. <i>Receptor D2 de dopamina en las células periglomerulares</i>	203
6.1.6.3.3.1. <u>Presencia del receptor D2 de dopamina en célula04 periglomerulares dopaminérgicas</u>	204
6.1.6.3.3.2. <u>Presencia del receptor D2 de dopamina en células periglomerulares que expresan GCs</u>	204
6.2. Análisis de las vías de actuación del óxido nítrico en la corriente migratoria rostral ...	204
6.2.1. <u>Vía de actuación de la GCs</u>	204
6.2.1.1. Identificación de las células que contienen GCs en la corriente migratoria rostral	205
6.2.1.2. Óxido nítrico y proliferación	206
6.2.1.3. Óxido nítrico y migración celular	207
6.2.1.4. Fuentes de óxido nítrico en la corriente migratoria rostral	208
6.2.1.5. Transductor intracelular de la señalización por óxido nítrico en neuroblastos migrantes	209
6.2.2. <u>Vía de la nitrosilación de proteínas</u>	210
ESQUEMAS	212
7. CONCLUSIONES	219
8. BIBLIOGRAFÍA	222
9. ANEXO I. PROTOCOLOS	251
10. ANEXO II. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	264

INTRODUCCIÓN

2.1. BULBO OLFATORIO: ORGANIZACIÓN Y FUNCIÓN

El reconocimiento de un elevado número de moléculas que permita la discriminación entre distintos olores, incluso cuando estos puedan ser muy parecidos, es importante para la biología de la mayoría de las especies animales, ya que estos olores están implicados en actividades clave, como son la búsqueda de alimento, la supervivencia en lo referente a interacciones entre predador y presa, la organización social (cuando se trate de animales sociales), la reproducción, el reconocimiento de crías... (Segev, 1999). Teniendo en cuenta estas razones, podemos entender que el sistema olfatorio tenga una gran importancia en muchos mamíferos.

En la cavidad nasal de los mamíferos, recubierto por una capa de mucus, se encuentra el epitelio olfatorio. Embebidas en esta mucosidad se encuentran las células encargadas de detectar las moléculas olorosas dispersas en el aire. Estas células son neuronas y reciben el nombre de neuronas receptoras de los olores. Las neuronas receptoras de los olores presentan una morfología bipolar; de un lado del soma sale una fina dendrita que acaba en una protuberancia de la cual emergen entre seis y doce cilios; en estos cilios, que son los que están embebidos en la mucosidad, es donde se reconocen los olores. Del lado opuesto del soma nace un axón no mielinizado que se juntará con los axones del resto de neuronas receptoras de los olores, formando el nervio olfatorio, que se dirige al cerebro y que llegará hasta el bulbo olfatorio principal (fig 1) (Cajal, 1911; Menco, 1984; Shipley y col., 2004).

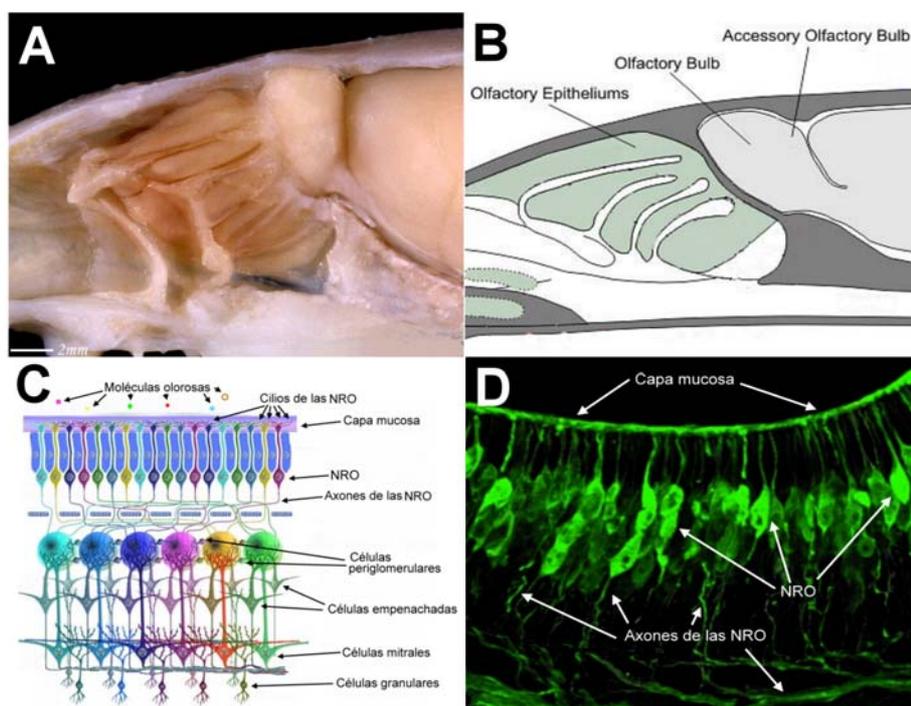


Figura 1. Bulbo olfatorio de la rata. A; Fotografía que muestra el interior de cráneo de una rata donde puede observarse cómo el epitelio olfatorio está íntimamente relacionado con la parte más anterior del cerebro, el bulbo olfatorio principal. B; Esquema comparativo donde se observa la localización del epitelio olfatorio y del bulbo olfatorio principal en el cerebro de la rata. C; Esquema explicativo de la organización del sistema olfatorio: aparecen las neuronas receptoras de los olores (NRO) enviando sus axones hasta el bulbo olfatorio principal. D; Micrografía detallada del epitelio olfatorio donde se ve la capa mucosa. Las NRO envían sus dendritas hacia la capa mucosa donde están inmersos sus cilios y, del lado opuesto del soma emergen sus axones para formar el nervio olfatorio. *Imágenes A, B y D modificadas de Adam C. Puche. Figura C modificada de Graeme Lowe 2003.*

Cuando el nervio olfatorio llega al bulbo olfatorio principal, las porciones terminales de los axones de las neuronas receptoras de los olores penetran en unas estructuras esféricas de

neuropilo muy características denominadas glomérulos olfatorios. En el interior de los glomérulos olfatorios se produce el primer relevo sináptico de la información olfatoria entre éstos terminales axónicos y las dendritas de las células principales del bulbo olfatorio principal (Shiple y Ennis, 1996; Shepherd y Greer, 1998).

El bulbo olfatorio principal es una región paleocortical del cerebro que presenta una organización laminar muy sencilla. Anatómicamente se distinguen 7 capas o láminas, que de la superficie hacia el interior reciben el nombre de capa del nervio olfatorio, capa de los glomérulos olfatorios, capa plexiforme externa, capa de las células mitrales, capa plexiforme interna, capa de las células granulares y capa de la sustancia blanca (fig 2).

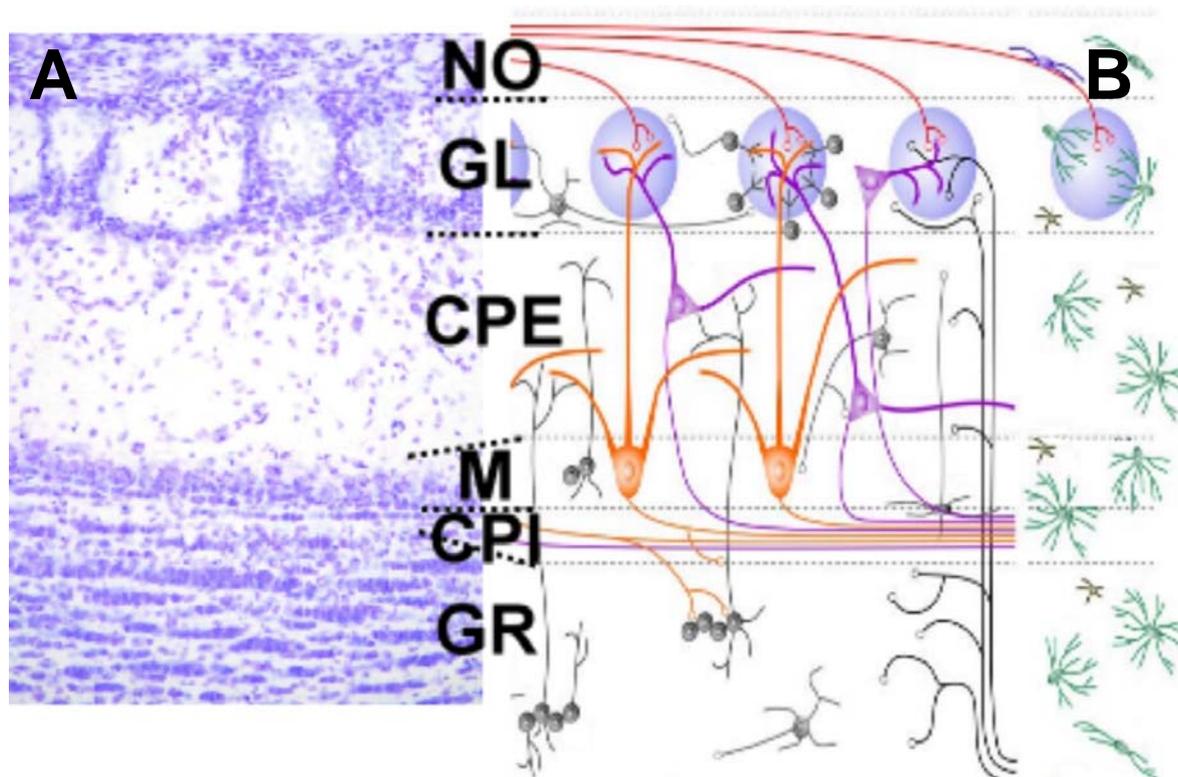


Figura 2. Organización del bulbo olfatorio principal de la rata. A; Tinción de Nissl realizada sobre una sección flotante de 60 µm del bulbo olfatorio principal de la rata donde pueden apreciarse las distintas capas. B; Esquema comparativo de la organización del bulbo olfatorio principal donde aparecen los tipos celulares que componen sus circuitos y su relación sináptica. NO: capa del nervio olfatorio; GL: capa de los glomérulos olfatorios; CPE: capa plexiforme externa; M: capa de las células mitrales; CPI: capa plexiforme interna; GR: capa de las células granulares. *Imagen B modificada de Adam C. Puche.*

Por la capa del nervio olfatorio discurren los axones de las neuronas receptoras de los olores antes de penetrar en los glomérulos olfatorios. La capa de los glomérulos olfatorios está formada por esas estructuras esféricas de neuropilo que le dan el nombre a la capa; en la rata pueden contabilizarse alrededor de 4200 glomérulos olfatorios, cuyo diámetro oscila entre las 80 y las 160 micras (Royet y col.,1998; Shiple y col., 2004). Cada glomérulo olfatorio se encuentra rodeado por diferentes tipos de neuronas que reciben, en su conjunto, el nombre de células juxtaglomerulares. La capa plexiforme externa está formada básicamente por neuropilo, aunque también hay células empenachadas, que constituyen uno de los tipos de células principales del bulbo olfatorio principal, y algunos tipos de interneuronas. En la capa de las células mitrales, se disponen los somas de las células mitrales, que constituyen el otro tipo de células principales del

bulbo olfatorio principal. Por la capa plexiforme interna discurren los axones de las células principales. En la capa de las células granulares estas células, que le dan el nombre a la capa, son el tipo de interneurona más abundante. Finalmente, la sustancia blanca está formada principalmente por axones mielínicos y por algunas interneuronas; en ella se encuentra, además, el extremo más rostral de la corriente migratoria rostral. Veamos con más detalle cómo se organiza la circuitería en cada una de las capas.

2.1.1. Capa del nervio olfatorio

La capa del nervio olfatorio es la capa más superficial del bulbo olfatorio. En ella podemos encontrarnos los axones no mielínicos de las neuronas receptoras de los olores y algunas células gliales (Cajal, 1911; Pinching y Powell, 1971a). Envolviendo a los paquetes de axones, encontramos una especie de células gliales exclusivas del sistema olfatorio que tienen características intermedias entre astrocitos y células de Schwann; estas células son permisivas para el crecimiento axonal y el establecimiento de nuevas conexiones (Valverde, 2003) y reciben el nombre de glía envolvente (Doucette, 1989).

2.1.2. Capa de los glomérulos olfatorios

La capa de los glomérulos olfatorios se encuentra situada directamente por debajo de la capa del nervio olfatorio. En esta capa se producirá el primer relevo y modificación de la información olorosa.

2.1.2.1. Tipos celulares

Como se ha dicho previamente, los glomérulos olfatorios son estructuras esféricas formadas por neuropilo; alrededor de este neuropilo se sitúan los somas de distintos tipos neuronales (las llamadas células juxtglomerulares) y células gliales, constituyendo la región periglomerular.

El término de células juxtglomerulares engloba a tres tipos neuronales diferentes: las células periglomerulares (PG), las células empenachadas externas y las células superficiales de axón corto. Las células periglomerulares y las células superficiales de axón corto están dentro de la categoría de interneuronas, mientras que las células empenachadas externas forman parte de la población de las células principales del bulbo olfatorio principal. Las células gliales que se encuentran alrededor de los glomérulos olfatorios son, principalmente, astrocitos.

2.1.2.1.1. Células periglomerulares

Cuando analizamos a microscopía óptica la capa de los glomérulos olfatorios, las células periglomerulares son fáciles de identificar porque son las células más abundantes y las de menor tamaño. Las células periglomerulares presentan un soma esférico, cuyo

diámetro oscila entre las 5 μm y las 8 μm . De un lado del soma, sale una dendrita primaria que penetra en el interior de un glomérulo olfatorio y del lado opuesto sale su axón (fig 3).

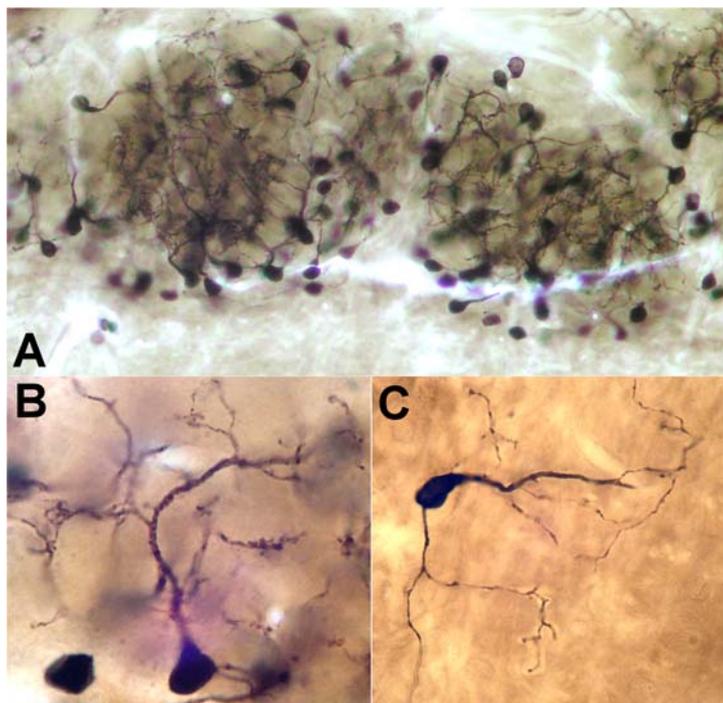


Figura 3. Células periglomerulares. Los somas de las células periglomerulares se sitúan alrededor del neuropilo glomerular y envían sus dendritas hacia el interior del glomérulo olfatorio donde se ramifica. A; células periglomerulares alrededor de dos glomérulos olfatorios. B y C; detalle de dos células periglomerulares teñidas con DAB.

El interior del soma está ocupado, casi en su totalidad, por el núcleo que, analizado a microscopía electrónica de transmisión, tiene una apariencia irregular, con una distribución heterogénea de la cromatina, y en él es frecuente la existencia de profundas indentaciones. Los orgánulos típicos se organizan en el delgado anillo de citoplasma existente alrededor del núcleo (Pinching y Powell, 1971b).

La gran mayoría de las células periglomerulares presentan una única dendrita primaria que penetra en el interior de un glomérulo olfatorio donde se ramifica. Sus ramificaciones no se extienden de forma homogénea por todo el glomérulo olfatorio, sino que suelen quedar restringidas a una zona concreta del neuropilo glomerular (Shiple y col., 2004). Muchas dendritas presentan ramificaciones varicosas de las cuales emergen un gran número de apéndices (Pinching y Powell, 1971b; Shiple y col., 2004). Estos apéndices son de dos tipos: espinas (región de la dendrita donde las células periglomerulares reciben contactos sinápticos) y gémulas (región de la dendrita donde las células periglomerulares reciben y realizan contactos sinápticos).

En cortes ultrafinos vistos a microscopía electrónica, los perfiles de las dendritas de las células periglomerulares presentan un contorno muy irregular. En el interior de los troncos dendríticos es fácil observar cisternas de retículo endoplasmático liso, ribosomas, mitocondrias y microtúbulos; además, las dendritas contienen un gran número de vesículas, estando particularmente concentradas en las varicosidades y en las gémulas,

donde aparecen agrupadas alrededor de las especializaciones sinápticas. Estas vesículas presentan un aspecto aplanado (Pinching y Powel, 1971b).

Del soma de las células periglomerulares, del lado opuesto al que da origen a la dendrita primaria, emerge el axón. Los axones de las células periglomerulares, que ocasionalmente se ramifican, proyectan predominantemente a la región periglomerular, no llegando más allá de los tres o cuatro glomérulos próximos (Shiple y col., 2004). Una característica de estos axones es la presencia, a intervalos irregulares, de muchos botones *en passant*. A microscopía electrónica de transmisión, los segmentos iniciales de los axones presentan pocos microtúbulos; en ellos se pueden observar ribosomas libres, cuerpos multivesiculares, vesículas de núcleo denso, vesículas recubiertas y vesículas aplanadas. Los terminales axónicos contienen abundantes vesículas aplanadas y alguna vesícula de núcleo denso. Estos terminales realizan contactos sinápticos simétricos sobre las dendritas de las células principales (Pinching y Powell, 1971b).

Existen diferentes marcadores neuroquímicos que sirven para marcar y clasificar los distintos tipos de células periglomerulares. Estos marcadores serán comentados en profundidad en el apartado 2.1.1.3.

2.1.2.1.2. Células empenachadas externas

Las células empenachadas externas son las células de mayor tamaño de la capa de los glomérulos olfatorios. El diámetro de los somas de estas células oscila entre las 10 y las 17 μm . Las células empenachadas externas se encuentran preferentemente distribuidas en la zona más profunda de la capa de los glomérulos olfatorios, estando casi en contacto con la capa plexiforme externa (fig 4). Presentan una dendrita primaria apical que penetra en el interior de un único glomérulo olfatorio y allí se ramifica repetidamente. Los axones de las células empenachadas externas emergen del soma o de la porción inicial de la dendrita.

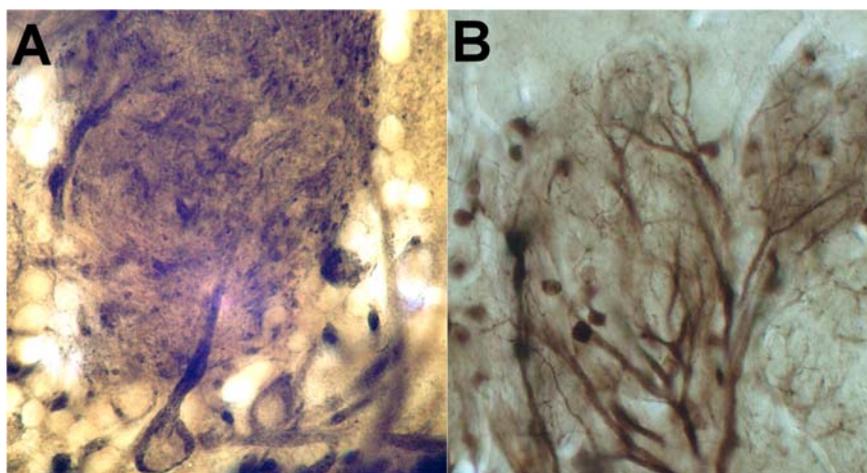


Figura 4. Células empenachadas externas. Las células empenachadas externas forman parte de la población de las células principales del bulbo olfatorio principal. A; soma de una célula empenachada externa situada en la zona más profunda de la capa de los glomérulos olfatorios, próxima a la capa plexiforme externa; presenta un soma de morfología poligonal y puede apreciarse que la dendrita apical penetra en el interior de un único glomérulo. B; dendrita apical de una célula empenachada externa que se ramifica en el interior del glomérulo olfatorio.

El soma de las células empenachadas externas presenta una morfología ovoide, fusiforme o poligonal y tiene abundante citoplasma. A microscopía electrónica de transmisión, el citoplasma presenta un aspecto electronlúcido; en su interior pueden encontrarse polirribosomas, un aparato de Golgi bien desarrollado y abundante retículo endoplasmático rugoso. El núcleo contiene una fina capa de heterocromatina adherida a la membrana nuclear interna y es mucho más eucromático que el núcleo de las células periglomerulares. Presenta, además, un nucleolo bien definido.

La dendrita de las células empenachadas externas frecuentemente es varicosa y sin espinas; el número de varicosidades va aumentando conforme la dendrita se ramifica en el interior del glomérulo olfatorio. El interior de las dendritas es electronlúcido y en el interior se observan microtúbulos perfectamente ordenados, cisternas de retículo endoplasmático liso, ribosomas libres y algunas mitocondrias. En el interior de los perfiles dendríticos también aparecen vesículas de morfología esférica. Estas vesículas, normalmente, aparecen en pequeños grupos situados próximos a los engrosamientos sinápticos. También aparecen algunas vesículas de núcleo denso. Las porciones terminales de las dendritas son unos procesos muy finos (de aproximadamente 0.2 μm de diámetro) y se encuentran completamente rodeados por los terminales axónicos del nervio olfatorio.

Los axones de las células empenachadas externas realizan un tortuoso recorrido por la región periglomerular donde algunos producen ramificaciones laterales. Estos axones, después de recorrer porciones de la región periglomerular, atraviesan la capa plexiforme externa y la capa de las células mitrales y se dirigen hacia la capa plexiforme interna. Allí se organizan con una especificidad topográfica muy alta constituyendo lo que se ha dado en llamar el sistema de asociación intrabulbar (Liu y Shipley, 1994). En sus botones se pueden encontrar vesículas sinápticas de morfología esférica y vesículas de núcleo denso (Pinching y Powell, 1971b). Estos botones realizan contactos sinápticos asimétricos sobre sus dianas.

Para identificar las células empenachadas se utilizan diferentes marcadores neuroquímicos como la proteína ligante de calcio neurocalcina (Bastianelli y col., 1993; Briñón y col., 1998) o el neuropéptido colecistoquinina (CCK) (Liu y Shipley, 1994).

2.1.2.1.3. *Células superficiales de axón corto*

Las células superficiales de axón corto (fig 5) son menos abundantes en la capa de los glomérulos olfatorios que las células periglomerulares o las células empenachadas externas. Su soma es ligeramente mayor y más irregular que el de las células periglomerulares. Presentan más de una dendrita que se extienden por la región periglomerular de los glomérulos olfatorios, pero que nunca penetran en los mismos. Los axones de estas células son cortos y se extienden por la región periglomerular de los glomérulos adyacentes (Pinching y Powell, 1971b; Shipley y col., 2004).

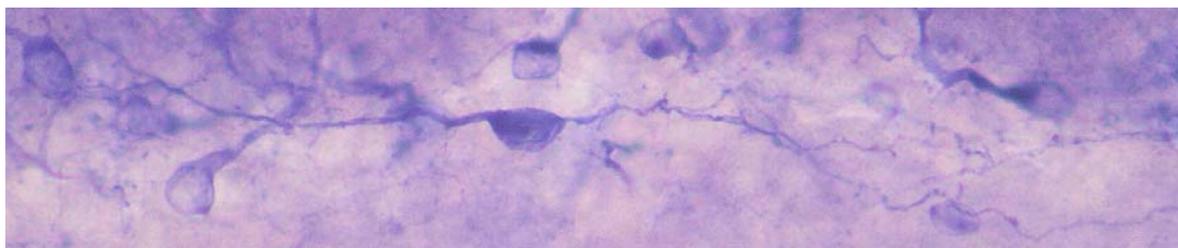


Figura 5. Célula superficial de axón corto

El soma de las células superficiales de axón corto tiene una morfología esférica, alargada u ovoidal y su tamaño oscila entre las 8 y las 17 μm (Price y Powell, 1970a; Crespo y col., 1995). Vistas a microscopía electrónica, estas células presentan una moderada cantidad de citoplasma alrededor del núcleo; en este citoplasma pueden observarse grupos de cisternas de retículo endoplasmático rugoso, pero nunca complejos tan grandes como en las células principales. El núcleo tiene una apariencia irregular y presenta indentaciones nucleares y un nucleolo bien definido.

Las dendritas de las células superficiales de axón corto son gruesas, varicosas, de superficie irregular y pueden presentar espinas. A microscopía electrónica se ve que los microtúbulos aparecen dispersos por el interior de las dendritas, sin presentar una disposición ordenada. En el interior de las dendritas, aparecen muy pocas vesículas y estas son de morfología irregular.

Los axones, que emergen directamente del soma, se ramifican poco y suelen tener botones *en passant* (Shiple y col., 2004). El citoplasma del cono axónico es escaso; en él puede verse retículo endoplasmático rugoso, muchos ribosomas y vesículas. Aquí, los microtúbulos aparecen agregados (Pinching y Powell, 1971b). Los botones de estas células realizan contactos sinápticos simétricos sobre sus dianas.

Para identificar células superficiales de axón corto utilizamos como herramientas marcadores neuroanatómicos, como por ejemplo la actividad enzimática NADPH-diaforasa (Scott y col., 1987), el neurotransmisor sustancia P (Pinching y Powell, 1971b; Schneider y Macrides, 1978) o la proteína ligante de calcio parvalbúmina (PV) (Kosaka y col., 1994).

2.1.2.2. **Organización del neuropilo en el interior glomerular**

El neuropilo que se encuentra en el interior de los glomérulos olfatorios está formado por los terminales axónicos de las neuronas receptoras de los olores, por los penachos de las dendritas primarias de las neuronas principales del bulbo olfatorio (las células mitrales y las células empenachadas), por las dendritas de las células periglomerulares, por las porciones terminales de algunos axones de origen centrífugo y por procesos gliales. En un principio se pensaba que todos estos elementos del neuropilo se distribuían de manera más o menos uniforme en el interior glomerular, pero durante los últimos quince años se ha observado una distribución compartimentalizada de los mismos (Halasz y Greer, 1993; Johnson y col., 1996;

Treloar y col., 1996; Chao y col., 1997; Kosaka y col., 1997; Kasowski y col., 1999; Toida y col., 2000).

La distribución de los terminales axónicos del nervio olfatorio dentro del neuropilo es lo que marca dos compartimentos claramente diferenciados. La zona dónde están dispuestos los terminales axónicos del nervio olfatorio recibe los nombres de zona axónica o compartimento sensorial. El resto del neuropilo glomerular, donde no se encuentra el nervio olfatorio, se conoce como zona dendrítica o compartimento sináptico (Kosaka y col., 1995, 1997, 1998; Toida y col., 1998, 2000; Chao y col., 1997; Kasowski y col., 1999). Estos dos compartimentos se encuentran físicamente separados por procesos de células gliales; sin embargo, ambos compartimentos se encuentran estrechamente interdigitados (fig 6).

En el compartimento sensorial se encuentran parte de las porciones más distales de las dendritas de las células principales y de algunas células periglomerulares junto con los terminales axónicos del nervio olfatorio. A este compartimento no llegan los axones de origen centrífugo; tampoco hay en él procesos de células gliales. Tanto las dendritas de las células principales como las de las células periglomerulares que aquí se encuentran, reciben contactos sinápticos asimétricos desde los terminales axónicos del nervio olfatorio (fig 7A) (Pinching y Powell, 1971a; Mori y col., 1983; Orona y col., 1984); en este compartimento también pueden observarse relaciones sinápticas entre las células principales y las células periglomerulares. Estas relaciones incluyen: 1) contactos sinápticos asimétricos desde las células principales sobre las células periglomerulares; 2) contactos sinápticos simétricos desde las células periglomerulares sobre las células principales; 3) pares de contactos recíprocos donde una célula principal realiza un contacto sináptico asimétrico sobre una célula periglomerular y esta célula periglomerular, a su vez, realiza un contacto sináptico simétrico sobre esta misma célula principal (fig 7B).

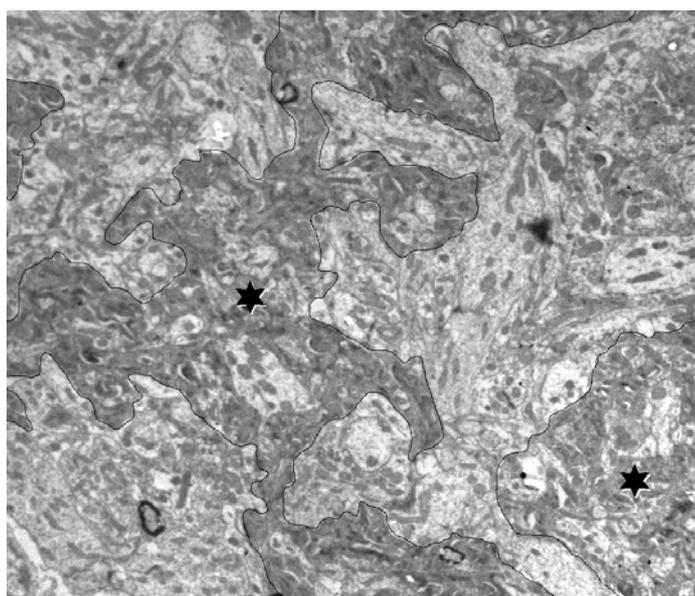


Figura 6. Neuropilo glomerular. Detalle del interior del neuropilo glomerular, donde puede observarse la diferencia entre el compartimento sensorial (zona electrondensa; estrellas) y el compartimento sináptico (zona electronlúcida).

En el compartimento sináptico coexisten las ramificaciones dendríticas de las células principales, de las células periglomerulares, algunos axones de origen centrifugo y procesos de células gliales. Es en este compartimento donde se producen la gran mayoría de interacciones sinápticas entre las dendritas de las células principales y las de las células periglomerulares. Estas relaciones son como las descritas en el compartimento sensorial y, además, incluyen contactos dendrodendríticos entre células periglomerulares (fig 7C). Los contactos sinápticos entre los distintos elementos que componen el neuropilo glomerular, son los primeros encargados de modificar y refinar parte de la información sensorial recibida antes de que ésta sea enviada al córtex olfatorio (Aungst y col., 2003; Saghatelian y col., 2003; Schoppa y Urban, 2003). El segundo punto de procesamiento de la información sensorial tiene lugar en la capa plexiforme externa, en lo que se conoce como inhibición lateral (descrito con más detalle en el apartado 2.1.3.2).

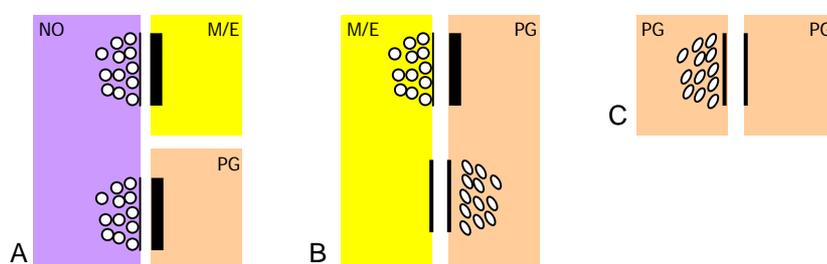


Figura 7. Conectividad sináptica en el interior del neuropilo glomerular. El nervio olfatorio (NO) realiza contactos sinápticos asimétricos sobre las dendritas de las células principales (M/E) y sobre las de las células periglomerulares (PG) (A). Estos contactos sólo tienen lugar en el compartimento sensorial. Las M/E realizan contactos sinápticos asimétricos sobre las PG (B). Las PG realizan contactos sinápticos simétricos sobre M/E (B) y, en el compartimento sináptico, sobre otras PG (C)

2.1.2.3. *Caracterización neuroquímica de las células periglomerulares*

Los primeros estudios neuroanatómicos y neuroquímicos describían a las células periglomerulares como una población homogénea de interneuronas (Pinching y Powell, 1971b); sin embargo, estudios realizados durante estos últimos años han revelado que las células periglomerulares difieren en algunos aspectos de su conectividad dentro del glomérulo y de sus propiedades neuroquímicas. Esto permite diferenciar varias poblaciones y subpoblaciones de células periglomerulares (Gall y col., 1987; Halász y col., 1985; Kosaka y col., 1987 1995, 1996; Seroogy y col., 1989; Rogers, 1992; Puopolo y Belluzzi, 1998). Respecto a la conectividad dentro del neuropilo glomerular, una parte de las células periglomerulares extiende sus ramificaciones dendríticas tanto por el compartimento sináptico como por el compartimento sensorial, lo que les permite recibir contactos sinápticos asimétricos directamente desde el nervio olfatorio. Esta población de células periglomerulares recibió el nombre de células periglomerulares de tipo 1 (PG1) (Kosaka y col., 1987). Otra población de células periglomerulares ramifica sus dendritas únicamente por el compartimento sináptico y nunca por el sensorial, de manera que no reciben contactos sinápticos

directamente desde el nervio olfatorio. Este grupo de células periglomerulares recibió el nombre de células periglomerulares de tipo 2 (PG2).

Dentro de la población de PG1 existen al menos 4 subpoblaciones diferentes, que difieren en sus características neuroquímicas (fig 8). Dos de estas subpoblaciones tienen en común que contienen el neurotransmisor de carácter inhibitor ácido gamma-aminobutírico (GABA); sin embargo cada subpoblación contiene, además, otro neurotransmisor diferente. Una de estas subpoblaciones contiene la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y produce dopamina (PG1-TH) (Toida y col., 2000); la otra, contiene la isoforma neuronal de la sintasa del óxido nítrico (nNOS) y produce óxido nítrico (PG1-nNOS) (Crespo y col., 2003). Las otras dos subpoblaciones de PG1 tienen en común el que son GABA-inmunonegativas y además ambas expresan neuropéptidos, aunque cada subpoblación expresa un neuropéptido diferente: una expresa somatostatina (SOM) (PG1-SOM) y la otra expresa CCK (PG1-CCK) (Gutiérrez-Mecinas y col., 2005).

La población de PG2 presenta dos subpoblaciones que difieren en la proteína quelante de calcio que expresan: una de las subpoblaciones expresa calbindina D-28k (CB) (PG2-CB) (Toida y col., 1998, 2000) y la otra calretinina (CR) (PG2-CR). Ninguna de estas dos subpoblaciones es inmunorreactiva para GABA (fig 8) (Crespo y col., 2006, para una revisión).

PG1		PG2	
TH+	GABA+	CB+	GABA-
nNOS+		CR+	
SOM+	GABA-		
CCK+			

Figura 8. Tipos de células periglomerulares. Esquema resumen con los tipos de poblaciones y subpoblaciones en las que se dividen las células periglomerulares (PG).

Las dos poblaciones de células periglomerulares descritas hasta el momento constituyen, sin embargo, sólo el 50% de todas las células periglomerulares que se estima que hay en el bulbo olfatorio principal (Kosaka y col., 1995), de manera que desde el punto de vista neuroquímico y de conectividad con el nervio olfatorio aún queda aproximadamente la mitad de la población total de células periglomerulares por caracterizar.

2.1.3. Capa plexiforme externa

Como el nombre de “capa plexiforme” indica, esta capa está casi exclusivamente formada por neuropilo que corresponde, principalmente, a las dendritas de las células principales y a las dendritas apicales de las células granulares (se describirán a continuación en la sección 2.1.5.1.1.). Sin embargo, también pueden encontrarse algunos tipos celulares residentes en esta capa: las células empenachadas, las interneuronas de la capa plexiforme externa, y células gliales, principalmente astrocitos.

2.1.3.1. *Tipos celulares*

2.1.3.1.1. *Células empenachadas*

Todas las células empenachadas (fig 9) entran dentro de la categoría de las células de proyección del bulbo olfatorio principal. Su morfología es variable, observándose desde morfologías más fusiformes hasta otras células con morfología poligonal. Todas las células empenachadas presentan una dendrita apical que discurre más o menos perpendicular a la laminación del bulbo olfatorio, se dirige hacia la capa de los glomérulos olfatorios y penetra en un único glomérulo olfatorio donde se ramifica. Además, suelen tener dendritas secundarias que discurren por la capa plexiforme externa (Price y Powell, 1970a; Shepherd, 1972; Jackowski y col., 1978).

Existen al menos tres tipos diferentes de células empenachadas según su tamaño, localización, propiedades neuroquímicas y electrofisiológicas: células empenachadas externas, medias e internas (Allison, 1953; Andres, 1965; Pinching y Powell, 1971b; Macrides y Schneider, 1982; Mori y col., 1983; Orona y col., 1984). Las células empenachadas externas son las más pequeñas (entre 10 y 15 μm) y las más próximas a la capa de los glomérulos olfatorios, y las células empenachadas internas son las más grandes (entre 15 y 18 μm) y las más próximas a la capa de las células mitrales (Pinching y Powell, 1971b; Shipley y col., 2004).

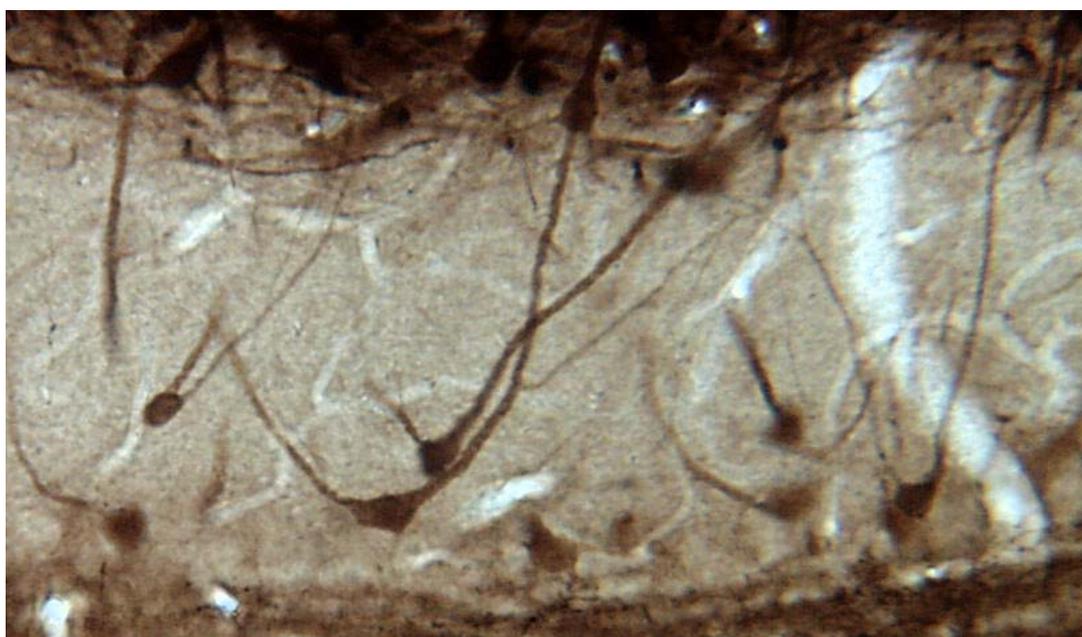


Figura 9. Células empenachadas.

Los distintos tipos de células empenachadas también difieren en el destino de sus proyecciones axónicas: las células empenachadas externas proyectan a la capa plexiforme interna del mismo bulbo olfatorio en el que se encuentran, justo al lado contrario de donde se encuentra el soma. Esta proyección se conoce con el nombre de sistema de asociación intrabulbar (Schoenfeld y Macrides, 1984; Liu y Shipley, 1994; Shipley y col., 2004). Por el

contrario, las células empenachadas medias y las células empenachadas internas proyectan fuera del bulbo olfatorio principal donde se encuentran (Schoenfeld y col., 1985; Scott, 1986; 1987). Las características ultraestructurales de todas las células empenachadas son básicamente las mismas que se han descrito en el apartado 2.1.1.1.2. donde se describen las células empenachadas externas.

Podemos identificar neuroanatomicamente todas las células empenachadas empleando diversos marcadores neuroquímicos, como la CCK o la neurocalcina.

2.1.3.1.2. *Interneuronas de la capa plexiforme externa*

Existen diferentes tipos morfológicos de interneuronas en la capa plexiforme externa, que reciben el nombre de células de Van Gehuchten (Van Gehuchten y Martin, 1891), células superficiales de axón corto y células multipolares (fig 10). Estas interneuronas difieren en su morfología, pero tienen prácticamente las mismas características neuroquímicas, ultraestructurales y presentan la misma conectividad sináptica (Kosaka y col., 1994). Además, los tres tipos utilizan GABA como neurotransmisor.

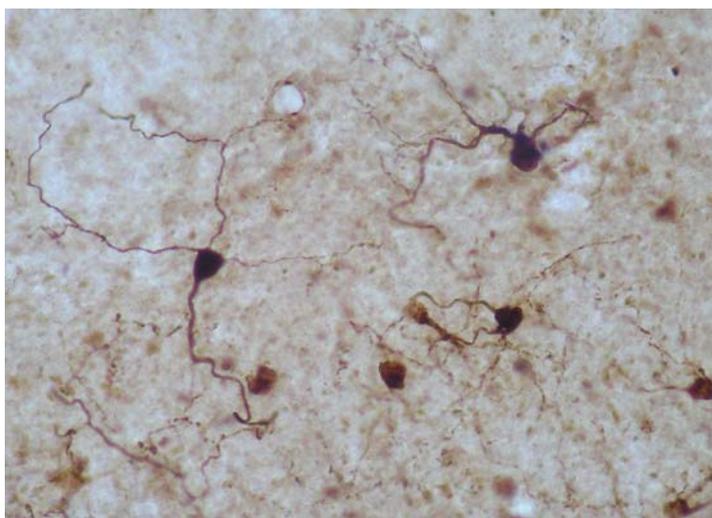


Figura 10. Distintos tipos de interneuronas de la capa plexiforme externa. Los tres tipos de interneuronas existentes en la capa plexiforme externa, a pesar de diferir en su morfología, tienen las mismas características neuroquímicas; todas ellas expresan la proteína ligante de calcio parvalbúmina (PV) y utilizan GABA como principal neurotransmisor.

Los somas de estas células, que presentan un tamaño de entre 12 y 17 μm (Shiple y col., 2004), tienen distintas morfologías y pueden ser desde fusiformes a redondeadas; emiten entre 2 y 5 procesos dendríticos que se ramifican por todo el neuropilo de la capa plexiforme externa sin ninguna orientación específica. Las ramas más finas aparecen extremadamente varicosas, y algunas de ellas pueden presentar espinas y gémulas. Cuando se analizan a microscopía electrónica los somas de estas interneuronas, son características las indentaciones nucleares; en el citoplasma puede observarse un aparato de Golgi bien desarrollado y abundantes mitocondrias. Los terminales sinápticos de estas células son principalmente las varicosidades y las gémulas de sus dendritas. En todos los casos, se trata de perfiles de gran tamaño que se caracterizan por tener una gran cantidad

de mitocondrias. Es en estos perfiles donde las interneuronas de la capa plexiforme externa realizan contactos sinápticos simétricos y reciben, recíprocamente, contactos sinápticos asimétricos (Crespo y col., 2001).

En un principio se pensó que estas interneuronas realizaban contactos sinápticos inhibitorios sobre las dendritas de las células granulares. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que estas interneuronas no están inervando a las células granulares, sino que inervan, de manera específica, a las células principales (Toida y col., 1994, 1996; Crespo y col., 2001; Crespo y col., 2006).

Las interneuronas de la capa plexiforme externa pueden marcarse utilizando como marcadores neuroanatómicos PV (Kosaka y col., 1994) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Crespo y col., 2002).

2.1.3.2. Organización del neuropilo

En el neuropilo de la capa plexiforme externa se produce la inhibición lateral de las células principales que es la clave para facilitar la discriminación olorosa (Yokoi y col., 1995; Shipley y Ennis, 1996; Brennan y Keverne, 1997; Shepherd y Greer, 1998; Urban, 2002; Saghatelian y col., 2003; Egger y col., 2003).

Aquí, las dendritas de las células principales establecen contactos sinápticos dendrodendríticos con las dendritas de las células granulares y con las dendritas de las interneuronas de esta capa (Price y Powell, 1970a; Jackowski y col., 1978; Orona y col., 1983) (fig 11). Estos contactos son del siguiente modo: 1) las células principales realizan contactos sinápticos asimétricos sobre las células granulares y sobre las interneuronas GABAérgicas de la capa plexiforme externa; 2) tanto las células granulares como las interneuronas GABAérgicas de la capa plexiforme externa establecen contactos sinápticos simétricos sobre las células principales; 3) estos contactos se presentan frecuentemente como pares recíprocos (Toida y col., 1996; Crespo y col., 2001; Egger y Urban, 2006).

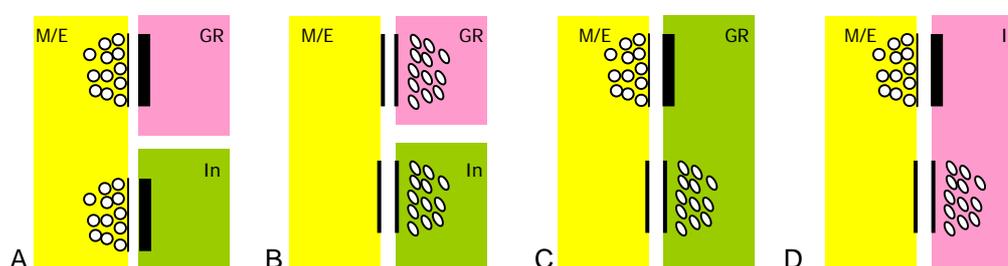


Figura 11. Tipos de contactos sinápticos en la capa plexiforme externa. Las células principales (M/E) realizan contactos sinápticos asimétricos sobre las células granulares (GR) y sobre las interneuronas de la capa plexiforme externa (In) (A); a su vez, están recibiendo contactos sinápticos simétricos desde las mismas (B). En ocasiones pueden producirse sinapsis recíprocas (C y D).

2.1.4. Capa de las células mitrales

La población de células mitrales es una de las poblaciones de neuronas principales del bulbo olfatorio. Estas células presentan somas con forma de mitra y con un tamaño que oscila

entre las 25 y las 35 micras; estos somas están ordenados unos junto a otros formando una monocapa (Price y Powell, 1970a; Shepherd, 1972; Scott, 1986; Shipley y col., 2004).

Las células mitrales presentan tres dendritas: una apical o primaria y dos laterales o secundarias (fig 12). La dendrita apical es más gruesa que las dendritas laterales. La dendrita apical atraviesa perpendicularmente la capa plexiforme externa y penetra en el interior de un único glomérulo olfatorio donde se ramifica (Cajal, 1911) y establece contactos sinápticos con los terminales axónicos del nervio olfatorio y con las dendritas de las células periglomerulares (descrito en el apartado 2.1.1.2.) (Price y Powell, 1970). Las dendritas laterales, que raramente se ramifican, se extienden de forma oblicua por la capa plexiforme externa (Price y Powell, 1970a; Jackowski y col., 1978), donde establecen relaciones sinápticas con las dendritas de las células granulares y con las dendritas de las interneuronas GABAérgicas de esta capa, tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Los axones de las células mitrales son mielínicos y salen directamente desde el soma, de su parte basal, normalmente por el lado opuesto al de salida de la dendrita apical (fig 12). Su segmento inicial y sus porciones preterminales carecen de envoltura mielínica. Los botones de estas células realizan contactos sinápticos asimétricos sobre sus dianas (Isaacson y Strowbridge, 1998).

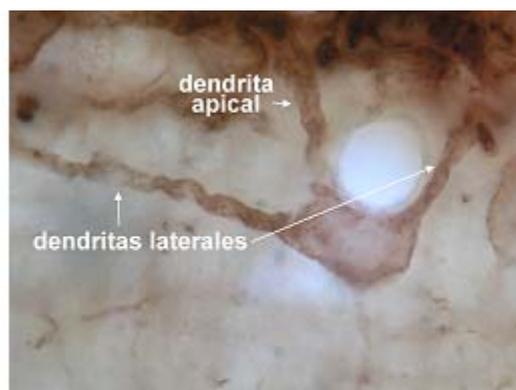


Figura 12. Célula mitral. Las células mitrales presentan una dendrita apical que atraviesa perpendicularmente la capa plexiforme externa, y dos dendritas laterales que se extienden y ramifican por la capa plexiforme externa. El axón sale del polo opuesto a donde lo hace la dendrita principal.

Cuando se estudian a microscopía electrónica, tanto el citoplasma como el núcleo de las células mitrales aparecen electronlúcidos; el núcleo contiene un nucleolo prominente, y, en rata, no presenta ningún tipo de indentación. Estas células tienen abundante citoplasma donde se observa el retículo endoplasmático rugoso bien ordenado formando cuerpos de Nissl multilaminares. La superficie de sus tres dendritas es lisa y en su interior aparecen microtúbulos dispuestos ordenadamente.

Aparte de las relaciones sinápticas ya comentadas, en las células mitrales también puede observarse la existencia de sinapsis recíprocas en el soma y en la porción más inicial del axón (Price y Powell, 1970a).

Las células mitrales pueden identificarse neuroanatómicamente utilizando como marcador neuroquímico CR.

2.1.5. Capa plexiforme interna

La capa plexiforme interna es una capa tan fina que muchas veces es difícil de identificar en el bulbo olfatorio de la rata con una tinción de Nissl. En esta capa prácticamente no existen tipos celulares, salvo alguna célula granular desplazada o, esporádicamente, alguna célula profunda de axón corto (ambos tipos celulares se describirán con detalle en el siguiente apartado). Por la capa plexiforme interna discurren los axones de las células de proyección del bulbo olfatorio, dendritas de las células granulares y otros axones de origen centrífugo (Price y Powell, 1970b; Shipley y Adamek, 1984; McLean y Shipley, 1987; McLean y col., 1989; Shipley, y col., 2004). Además, es aquí donde llegan y establecen sinapsis los axones de las células empenachadas externas del lado opuesto del mismo bulbo olfatorio, formando el sistema de asociación intrabulbar (Schoenfeld y Macrides, 1984; Liu y Shipley, 1994).

2.1.6. Capa de las células granulares

La capa de las células granulares es la capa más profunda del bulbo olfatorio donde podemos observar un abundante número de células.

2.1.6.1. **Tipos celulares**

2.1.6.1.1. *Células granulares*

Las células granulares son el tipo celular más abundante en el bulbo olfatorio principal y el más común de esta capa. Son células de pequeño tamaño que tienen un soma redondeado, cuyo diámetro medio oscila entre las 6 y las 10 μm . Estas células suelen estar agrupadas en pequeños grupos lineales, de entre 5 y 10 células dispuestas unas junto a otras más o menos paralelas a la laminación del bulbo olfatorio principal.

Las células granulares carecen de axones. Presentan una dendrita apical que se dirige hacia capas más superficiales del bulbo olfatorio principal y otras dos o más dendritas basales que se ramifican por toda la capa de las células granulares y se dirigen hacia regiones más profundas (fig 13). La dendrita apical es mucho más gruesa y más larga que las dendritas basales y llega hasta la capa plexiforme externa donde se ramifica y mantiene relaciones sinápticas con las células principales (Price y Powell, 1970a,c). Las dendritas de las células granulares pueden ser varicosas, sobre todo en su parte final, y poseen un gran número de gémulas y espinas sobre toda la superficie celular.

Cuando se estudian a microscopía electrónica, sus somas son fácilmente reconocibles. Presentan un gran núcleo oval con pequeñas indentaciones, donde la cromatina aparece altamente compactada; tienen, además, un nucleolo bien formado. Al igual que las células periglomerulares, las células granulares tienen poco citoplasma donde aparecen dispersos los pocos orgánulos que presentan; siempre aparece un aparato de

Golgi bien formado situado en la base de la dendrita apical (Price y Powell, 1970c; Shepherd y Greer, 1998; Shepherd y col., 2007).

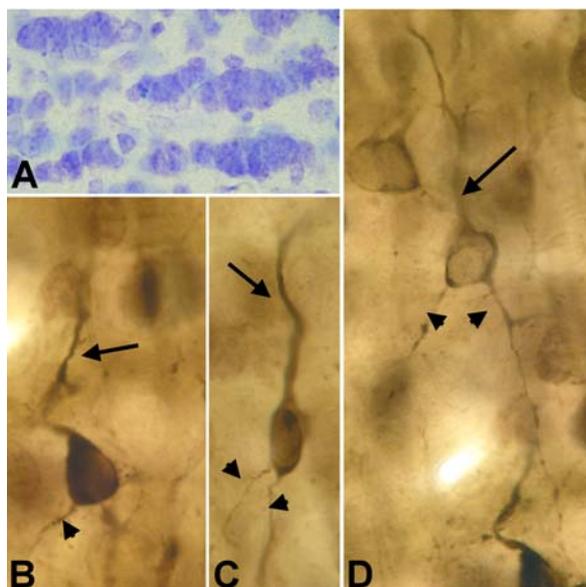


Figura 13. Células granulares. Las células granulares son neuronas de pequeño tamaño. A; Con una tinción de Nissl se observa como las células granulares suelen estar concentradas en pequeños grupos. B, C y D; detalle de diferentes células granulares (teñidas para CR con DAB) donde pueden observarse tanto la dendrita apical (flechas) como las dendritas basales (cabezas de flecha).

Algunos marcadores neuroquímicos utilizados como herramientas para marcar neuroanatómicamente las células granulares son la CB, la CR y la nNOS.

2.1.6.1.2. Células profundas de axón corto

Bajo la denominación de *células profundas de axón corto* se agrupan todas las interneuronas diferentes de las células granulares que se encuentran en esta capa (fig 14) (Schneider y Macrides, 1978; López-Mascaraque y col., 1986; Kakuta y col., 1998; Alonso y col., 2001). Este grupo engloba una población muy heterogénea de células, de las que morfológicamente se pueden distinguir cuatro tipos (Cajal, 1911; Price y Powell, 1970a):

- **Células verticales de Cajal** (fig 14A). Estas células están situadas en la región perimitral, entre la zona más interna de la capa plexiforme externa, la capa de las células mitrales, la capa plexiforme interna y zona más externa de la capa de las células granulares. Presentan un soma de morfología fusiforme o redondeadas de donde salen las dendritas que ascienden perpendicularmente a la laminación del bulbo olfatorio. Estas dendritas presentan pocas espinas, que suelen ser más comunes en las porciones más distales. Sus axones se extienden a través de la capa de las células mitrales hasta la capa plexiforme externa.
- **Células de Golgi** (fig 14C). Las células de Golgi presentan una morfología estrellada. De su soma emergen múltiples dendritas que se extienden en todas las direcciones; estas dendritas no suelen presentar espinas o, si las tienen, están

presentes en sus porciones más distales. Su axón se ramifica por la capa de las células granulares.

- **Células de Blanes** (fig 14B). Las células de Blanes también tienen una morfología estrellada pero, a diferencia de las células de Golgi, sus múltiples dendritas presentan un gran número de pequeñas espinas; sin embargo, estas espinas no se encuentran ni en el soma ni en las porciones más proximales de los troncos dendríticos. El axón de estas células surge de una de sus dendritas y se ramifica por la capa de las células granulares.
- **Células horizontales** (fig 14D). Su cuerpo celular, generalmente situado en la zona más externa de la capa de las células granulares y en la capa plexiforme interna, justo por debajo de la capa de las células mitrales, presenta una morfología fusiforme u ovoide, de donde emergen tres o más troncos dendríticos libres de espinas que se extienden por la capa de los granos, paralelos a la laminación del bulbo olfatorio. Sus axones atraviesan la capa de las células mitrales hasta llegar a la capa plexiforme externa.

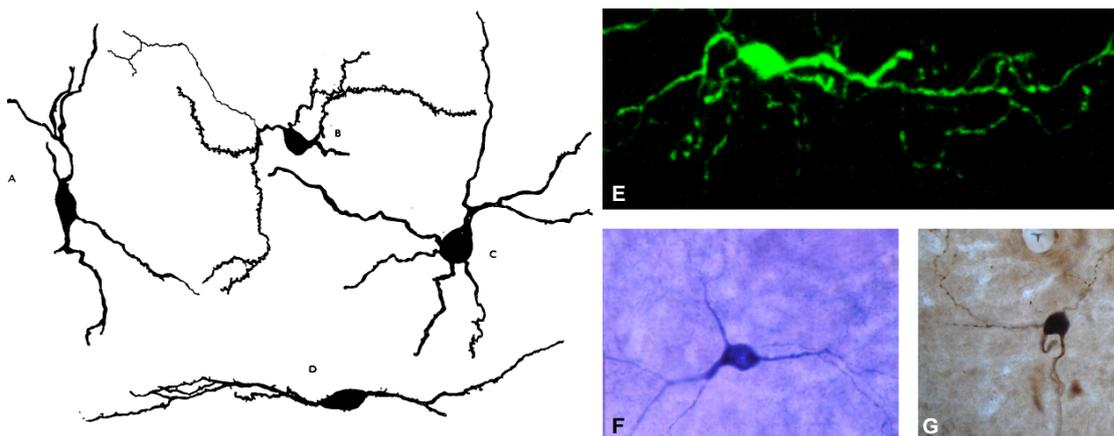


Figura 14. Células profundas de axón corto. Las células profundas de axón corto engloban una población muy heterogénea de células, de las que morfológicamente se pueden distinguir cuatro poblaciones. A; células verticales de Cajal. B; células de Blanes. C; células de Golgi. D; células horizontales. E-G; micrografías con distintos ejemplos de células profundas de axón corto. *Imágenes A, B, C y D son dibujos originales de cámara lúcida de Price y Powell, 1970a.*

A pesar de esta heterogeneidad morfológica, a microscopía electrónica de transmisión todos los somas de las células profundas de axón corto tienen la misma apariencia y son, a su vez, muy distintos a los somas de las células granulares. Tiene un núcleo pálido que presenta una indentación; en el citoplasma se encuentra una gran cantidad de ribosomas, un aparato de Golgi bien desarrollado, abundante retículo endoplasmático rugoso y mitocondrias y lisosomas son comunes (Price y Powell, 1970a).

Además de la heterogeneidad morfológica, las células profundas de axón corto presentan una mayor heterogeneidad neuroquímica ya que pueden diferenciarse distintas subpoblaciones de células en función de las sustancias neuroactivas que contienen:

- Subpoblaciones que expresan las proteínas ligantes de calcio CB, CR y PV (Briñón y col., 1992; Kosaka y col., 1994; Bastianelli y Pochet, 1995).

- Subpoblaciones que expresan los neuropéptidos SOM, CCK, neuropéptido Y (NPY) y VIP (Gall y col., 1986; Seroogy y col., 1989).
- Poblaciones que tienen actividades enzimáticas NADPH-diaforasa y acetilcolinesterasa (Scott y col., 1987; Le Jeune y Jourdan, 1994).

2.1.6.2. **Organización del neuropilo**

Durante mucho tiempo se asumió que las células profundas de axón corto, a pesar de presentar una gran heterogeneidad morfológica y neuroquímica, presentaban el mismo patrón de inervación, manteniendo todas ellas contactos sinápticos inhibitorios con las células granulares. Sin embargo, en los últimos años se han realizado estudios donde se demuestra que algunas de las poblaciones de células profundas de axón corto (por ejemplo, la población de células inmunopositivas para VIP) inervan específicamente a otras subpoblaciones de células profundas de axón corto (Gracia-Llanes y col., 2003). Según estos resultados, debería asumirse que no está clara la relación sináptica existente entre los tipos celulares en la capa de las células granulares.

2.1.7. Capa de la sustancia blanca

Esta es la capa más profunda del bulbo olfatorio. En esta capa se encuentran una gran cantidad de axones mielinizados que entran y salen del bulbo olfatorio. También aparecen algunos tipos celulares correspondientes a interneuronas, entre ellos:

- **Células gigantes.** Presentan un soma de morfología ovoide, piriforme o redondeada de gran tamaño (entre 25 y 30 micras). Presentan dos dendritas, varicosas y poco ramificadas, que salen de polos opuestos del soma celular y se extienden a lo largo de toda la capa; tanto sus dendritas como su axón discurren paralelos a la laminación del bulbo olfatorio (fig 15). Estas células han sido descritas utilizando como marcador neuroquímico la CB (Celio, 1990; Ohm y col., 1991; Briñón y col., 1992).
- Algunas células profundas de axón corto, principalmente células de Golgi y células de Blanes.

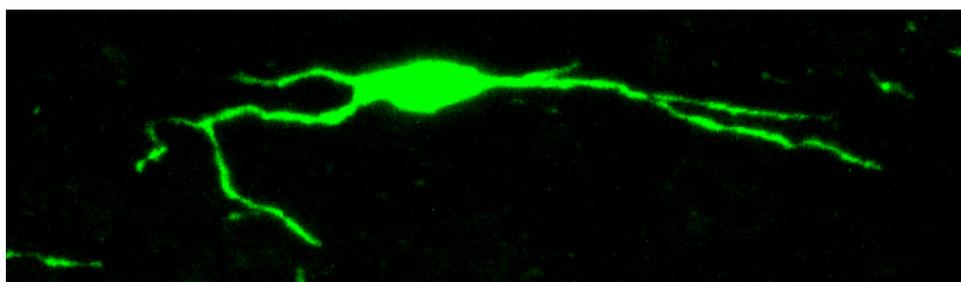


Figura 15. Célula gigante teñida con Cy2 para detectar CB.

Además de los elementos neuronales intrínsecos del bulbo olfatorio, en la sustancia blanca nos encontramos con la parte más rostral de la corriente migratoria rostral, íntimamente

asociada a las reminiscencias del ventrículo olfatorio que permanece obliterado en el bulbo olfatorio de la rata en individuos adultos. Los tipos celulares que nos podemos encontrar en la corriente migratoria rostral y restos del ventrículo olfatorio son (Lois y col., 1996; Doetsch y col., 1997):

- **Células de tipo A.** Son los neuroblastos migratorios que aparecen formando pequeños grupos o cadenas, frecuentemente asociadas a vasos sanguíneos; se caracterizan por la presencia de espacios intercelulares abiertos entre las diferentes células cuando son analizadas a microscopía electrónica de transmisión. En el citoplasma pueden observarse muchos microtúbulos y ribosomas libres. El núcleo presenta, ocasionalmente, invaginaciones; presenta una gran cantidad de cromatina muy laxa y algo de heterocromatina dispersa.
- **Células de tipo B.** Son células con características astrocitarias que contienen una gran cantidad de GFAP. Están encargadas de envolver a los grupos de células tipo A y forman estructuras similares a “tubos” por donde las células de tipo A migran.
- **Células de tipo C.** Son progenitores inmaduros. Son fácilmente identificables a microscopía electrónica de transmisión porque presentan un aparato de Golgi muy bien desarrollado y un gran nucleolo reticulado muy característico.
- **Células de tipo E.** Las células tipo E son endoteliales y son fácilmente reconocibles a microscopía electrónica de transmisión porque están en contacto con el ventrículo; se pueden observar en ellas numerosos cilios localizados en la superficie celular que está expuesta al ventrículo. Además, estas células se caracterizan por ser muy electrolúcidas y presentar numerosas mitocondrias.

2.2. ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico, también llamado monóxido de nitrógeno, es un gas incoloro, no polar, poco soluble en agua y termodinámicamente inestable que se encuentra en pequeñas cantidades en los seres vivos donde, entre otras funciones, actúa como sustancia neuromoduladora en el sistema nervioso. El óxido nítrico tiene un electrón desapareado en el último orbital que lo convierte en un radical libre que puede reaccionar con otros radicales libres o con metales de transición. En el organismo, tiende a reaccionar con el Fe^{2+} localizado en los grupos hemo de algunas proteínas, inactivándose.

En los seres vivos, el óxido nítrico es producido por la oxidación de la L-Arginina, una reacción catalizada por la sintasa del óxido nítrico (NOS) (Moncada y Higgs, 1993; Robbins y Grishan, 1997). Este óxido nítrico producido tiene una vida media limitada, de entre 3 y 5 segundos y es relativamente poco reactivo. Al ser un gas liposoluble difunde libremente a través de todas las membranas celulares en este breve período de tiempo pudiendo difundir entre 40 y

500 μm desde el lugar donde ha sido producido hasta sus dianas (Dawson y Snyder, 1994; Wood y Garthwaite, 1994; Lancaster, 1997; Krukoff, 1999; Contestabile, 2000; Esplugues, 2002).

Al óxido nítrico se le han atribuido muchas funciones diferentes en el organismo, entre ellas la regulación de la presión sanguínea por inducción de relajación muscular en los vasos sanguíneos que produce vasodilatación, la intervención en las respuestas inflamatorias, la participación en el proceso de agregación/disgregación de las plaquetas, la actuación como neurotransmisor y neuromodulador en el cerebro...

El descubrimiento del óxido nítrico como molécula señalizadora en el sistema nervioso ha supuesto un cambio en el concepto de comunicación neuronal, ya que presenta unas características especiales que lo convierten en una alternativa diferente a la transmisión sináptica convencional (Esplugues, 2002):

- no se almacena en vesículas sinápticas
- no es degradado por enzimas hidrolíticos
- no es liberado por exocitosis, sino que simplemente difunde a través de las membranas biológicas
- es producido sólo cuando se necesita

Uno de los efectos que tiene el óxido nítrico sobre las neuronas sobre las que actúa es la regulación de la liberación de otros neurotransmisores (Esplugues, 2002): acetilcolina (Li y Rand, 1989b; Gustafsson y col., 1990); noradrenalina (Li y Rand, 1989a; Boeckxstaens y col., 1993); dopamina (Hanbauer y col., 1992); glutamato (Sorkin, 1993; Montague y col., 1994); GABA (Kuriyama y Ohkuma, 1995); serotonina (Reiser, 1990a; Bogers y col., 1991); bombesina (Beltran y col., 1999); monóxido de carbono (Xue y col., 2000); opioides (Barnette y col., 1990); endotelinas (Reiser, 1990b). También está implicado en la modulación de la plasticidad sináptica mediante LTP y LTD, influye en el desarrollo cerebral y en la formación de la memoria, en el procesamiento visual, en los ritmos circadianos...

Por último, también se ha visto que el óxido nítrico está implicado en el desarrollo de distintas enfermedades, dentro y fuera del sistema nervioso. Por ejemplo, se ha visto que está implicado en procesos neurodegenerativos como algunas apoplejías, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, Parkinson.... (Krumenacker y col., 2004), e implicado en isquemia, artritis, miocarditis, colitis, nefritis, procesos cancerosos, diabetes y en algunas enfermedades autoinmunes. Es por ello que en los últimos años se ha intensificado el estudio del óxido nítrico en relación con estas enfermedades, con vistas a descubrir alguna terapia efectiva para mejorar la calidad de vida de las personas que las padecen o para descubrir si hay algún método de prevención de las mismas.

2.2.1. Producción del óxido nítrico

La enzima responsable de la producción del óxido nítrico es la NOS. Existen tres genes que codifican para tres isoformas distintas de NOS, dos de ellas que se expresan de forma constitutiva: isoforma endotelial de la NOS (eNOS) e isoforma neuronal de la NOS (nNOS) y una

que se expresa únicamente cuando es inducida (iNOS). Una característica propia y única de la nNOS es que tiene en su extremo N-terminal aproximadamente unos 300 aminoácidos más que las otras dos isoformas. Entre ellos, se encuentra una secuencia de unos 90 aminoácidos, denominada región PDZ, que está encargada del reconocimiento de otras proteínas que contengan esta misma región (una de las proteínas que contienen esta región es la proteína PSD-95, proteína que forma parte del complejo que forma la especialización postsináptica en los contactos sinápticos asimétricos). La nNOS es una enzima homodimérica dependiente de calcio y del complejo calcio-calmodulina (Ca/CaM); además, la calmodulina tiene un papel importante en la conformación de la enzima (fig 16) (Andrew y Mayer, 1999; Daff y col., 2001).

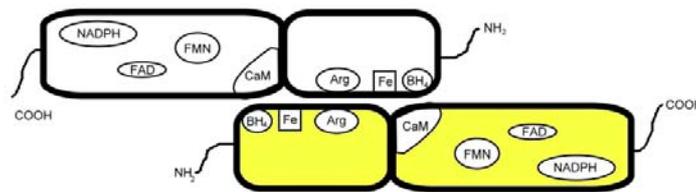


Figura 16. Estructura de la enzima sintasa del óxido nítrico. La enzima sintasa del óxido nítrico (NOS) funciona como un dímero compuesto por dos monómeros idénticos. Para su correcto funcionamiento necesita de Ca^{2+} , del complejo calcio-calmodulina (Ca/CaM) y de otros co-factores (flavonas, tetrahidrobiopterina y NADPH). *Imagen modificada de Andrew y Mayer 1999.*

La isoforma que más ampliamente se encuentra en el cerebro es la nNOS; sin embargo, sólo es expresada por un porcentaje relativamente pequeño de neuronas. La mayor densidad de células que están expresando nNOS en el cerebro se encuentra en el cerebelo y en el bulbo olfatorio. En el cerebro, se ha establecido una hipótesis para explicar la producción de óxido nítrico por parte de la nNOS, relacionándola con la transmisión sináptica glutamatérgica mediada por receptores tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Esta hipótesis se formuló en base a algunos datos que demostraban: 1) la existencia de receptores NMDA en las neuronas que contenían nNOS (Zhang y Wong-Riley, 1996; Aoki y col., 1997); 2) el hecho de que la mayoría de la nNOS estaba localizada en axones o en dendritas (Brenman y Bredt, 1997), concretamente en las espinas, concentrada sobre la especialización postsináptica (Brenman y col., 1996). Según el modelo establecido para explicar la producción de óxido nítrico en el cerebro, los receptores NMDA serían activados por glutamato, causando un flujo de Ca^{2+} hacia el interior celular; este Ca^{2+} , uniéndose a la calmodulina, es el que provocaría la activación de la enzima nNOS y la consecuente producción de óxido nítrico. Esto es posible *in situ* debido a la existencia de la proteína PSD-95, que interactúa con el dominio C-terminal del receptor NMDA y con la región PDZ de la nNOS, exponiendo, de esta manera, a la nNOS al complejo calcio-calmodulina (Ca/CaM) formado por el Ca^{2+} que penetra al interior celular. Cuando la concentración de Ca^{2+} aumenta en el interior celular (>400 nM) es cuando se produce el acople del complejo Ca/CaM a la nNOS, activándola, y dando lugar a la producción de óxido nítrico como respuesta (fig 17).

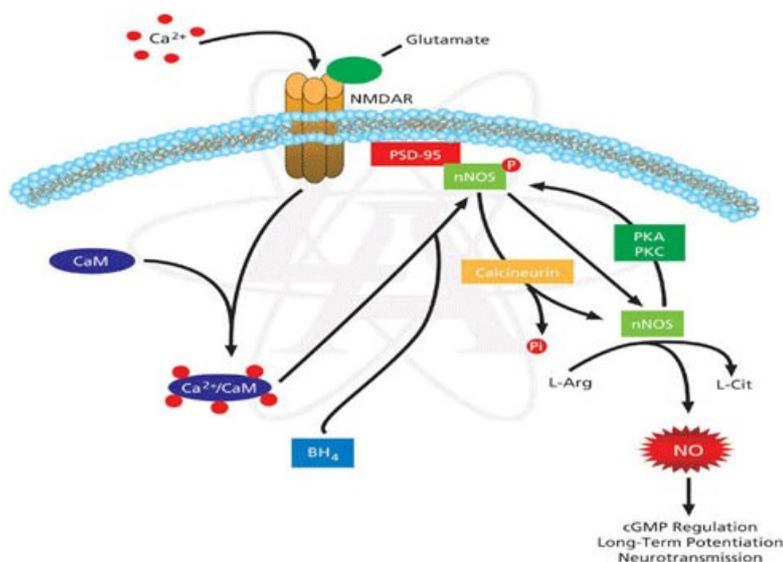


Figura 17. Proceso de producción de óxido nítrico (NO) tras la activación por glutamato del receptor tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Se basa en la existencia de una proteína, PSD-95, que interactúa con el dominio C-terminal del receptor NMDA por un lado, y con el dominio N-terminal (dominio PDZ) de la isoforma neuronal de la sintasa del óxido nítrico (nNOS), (Brenman y col., 1997; Kornau y col., 1995) por el otro. Este complejo ternario NMDA-PSD95-nNOS permite una exposición directa de la enzima nNOS al influjo de Ca^{2+} . Cuando la concentración de Ca^{2+} aumenta en el interior celular (>400 nM) se produce un acople del complejo calcio-calmodulina (Ca/CaM) a la enzima nNOS, activándola, y produciendo como respuesta óxido nítrico. *Imagen tomada de Sigma-Aldrich.*

A su vez, también se ha establecido que, en el cerebro, existen diferentes mecanismos de regulación de la nNOS, y por tanto, de regulación de la producción de óxido nítrico. Por un lado, es posible que el óxido nítrico producido por la nNOS actúe sobre el receptor NMDA mediante S-nitrosilación de algunas cisteínas, produciendo una disminución en la función del canal (Choi y col., 2000; Esplugues, 2002) y provocando así una disminución de la entrada de Ca^{2+} , una disociación del complejo Ca/CaM y la parada de la producción de óxido nítrico. Por otro, la proteína CAPON compete con la nNOS para unir los dominios PDZ de PSD-95; de este modo, CAPON determina la cantidad de nNOS que se “une” a la membrana plasmática a través de PSD-95. También puede haber una inhibición de la nNOS por la proteína PIN (proteína inhibidora de nNOS), cuya función consiste en desestabilizar los dímeros de nNOS. Por último, puede haber una interacción con caveolinas que desplazan el complejo Ca/CaM, inactivando a la nNOS.

2.2.2. Vías de actuación del óxido nítrico en el cerebro

Existen dos grandes vías de actuación del óxido nítrico en el cerebro. Una de ellas implica la activación de la enzima guanilato ciclasa soluble, con la consiguiente producción del segundo mensajero GMPc. La otra vía implica la actuación directa del óxido nítrico sobre proteínas, nitrosilándolas.

2.2.2.1. *Vía de la activación de la guanilato ciclasa soluble*

La enzima guanilato ciclasa soluble es, en condiciones fisiológicas, el receptor más importante de óxido nítrico en los seres vivos. Esta proteína pertenece a la familia de las

nucleótido-ciclasas, encargadas de convertir los nucleótidos trifosfato en nucleótidos monofosfatos cíclicos. Hasta ahora se han descubierto tres enzimas diferentes: la adenilato ciclasa, la guanilato ciclasa particulada y la ya mencionada guanilato ciclasa soluble (GCs). De ellas, sólo la GCs se encarga de producir GMPc a partir de GTP como respuesta a la unión de óxido nítrico.

A diferencia de la guanilato ciclasa particulada, que se encuentra anclada a membranas, la GCs se encuentra libre en el citosol. Es una enzima heterodimérica, con un grupo hemo unido, con lo que en realidad es una hemoproteína. Hasta ahora se han clonado 4 subunidades de la GCs ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$) de manera que, combinándose las distintas subunidades, se forman hasta 16 combinaciones diferentes de dímeros, aunque hasta ahora se ha visto que la únicas combinaciones que existen como proteínas funcionales en el tejido animal son las de $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ (Russwurm y Koesling, 2002). Estudios previos han demostrado que la expresión de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ ocurre en una parte de neuronas del cerebro. Trabajos muy recientes (Ding y col., 2004) han mostrado que existe casi un 100% de colocalización de ambas subunidades en estas neuronas, de manera que la detección de una de las dos subunidades es indicativa de que en esa célula puede encontrarse la GCs funcional. En estos estudios también se ha señalado que prácticamente no existen neuronas que coexpresen las enzimas nNOS y GCs, de forma que no hay neuronas que estén produciendo óxido nítrico y al mismo tiempo sean capaces de responder a él vía activación de la GCs (Garthwaite, 1991; Garthwaite y Boulton, 1995; Garthwaite y col., 1988; de Vente y col., 1998). Estos últimos datos respaldan el concepto de mensajero interneuronal por parte del óxido nítrico y apuntan a que no desempeña una función autocrina en las neuronas productoras.

En cuanto a la estructura de la GCs, esta enzima tiene un único de sitio de unión para el GTP. El dominio N-terminal es el dominio regulador de la proteína y el C-terminal es el encargado de catalizar la hidrólisis de GTP a GMPc. El grupo hemo está ligado a la GCs por un residuo de histidina de la subunidad $\beta 1$. La presencia del grupo hemo es imprescindible para que la GCs sea funcional (Craven y de Rubertis, 1978; Ignarro y col., 1990; Friebe y Koesling, 2003), de forma que si se elimina el grupo hemo se elimina también la posibilidad de activación inducida por óxido nítrico. Cuando el óxido nítrico se une al grupo hemo de la GCs, la unión existente entre el residuo de histidina y el hierro del grupo hemo se rompe; esto produce un cambio conformacional en la enzima que activa su función catalítica. De las diferentes formas redox que existen para el óxido nítrico (ON^- , ON^\bullet y ON^+) sólo el que no tiene ningún tipo de carga (ON^\bullet) es el que tiene capacidad para activar la enzima. A diferencia del grupo hemo de la hemoglobina contenida en los eritocitos, el grupo hemo de la GCs tiene muy poca afinidad por el O_2 , de manera que unirá casi específicamente óxido nítrico. Cuando el óxido nítrico esté difundiendo por el tejido y se encuentre con una molécula de GCs, se unirá a su grupo hemo y activará su función catalítica, lo que desencadenará la producción masiva

de GMPc en el interior celular, que actuará como segundo mensajero (Schmidt y col., 1993; Denninger y Marletta, 1999; Mateo y Artiñano, 2000; Friebe y Koesling, 2003; Krumenacker y col., 2004; Bicker, 2005).

Este GMPc puede tener un amplio rango de efectos en las células (Murad, 1994). En el cerebro, se ha visto que, junto con el AMPc, puede estar regulando procesos tales como la fototransducción, la olfacción (Broillet y Firestein, 1999), la neurotransmisión (Garthwaite, 1991; Kind y Neumann, 2001) y el desarrollo neural (Truman y col., 1996; Gibbs y Truman, 1998; Schachtner y col., 1999; Van Wagenen y Rehder, 1999; Gibbs y col., 2001). Otros estudios han demostrado que el GMPc está implicado en la formación de la red neuronal durante la maduración (Scholz y Truman, 2000; Bicker, 2001; Scholz y col., 2001). Además, evidencias de modelos *in vivo* sugieren que el GMPc está implicado en procesos de aprendizaje y memoria en el adulto (Bernabeu y col., 1997; Kendrick y col., 1997; Izquierdo y col., 2000; Edwards y col., 2002).

Como segundo mensajero, el GMPc puede activar tres vías de señalización diferentes dentro de las células:

- Canales iónicos activados por la unión de nucleótidos cíclicos.
- Proteínas kinasas dependientes de GMPc.
- Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos.

Es de esperar, por lo tanto, que los efectos del GMPc en las células del bulbo olfatorio principal, como elemento de la señalización del óxido nítrico, estén mediados por estas tres vías.

2.2.2.1.1. Canales iónicos activados por la unión de nucleótidos cíclicos

Los canales iónicos activados por la unión de nucleótidos cíclicos (CNG) son una gran familia heterogénea de canales catiónicos que comparten la misma estructura. Los CNG fueron originalmente identificados en fotorreceptores y en las neuronas receptoras de los olores de vertebrados, donde se encargan de mediar la transducción de señales sensoriales (Kaupp, 1995; Finn y col., 1996; Wei y col., 1998).

En mamíferos se ha visto que una familia de 6 genes codifica para diferentes subunidades de CNG: cuatro subunidades tipo A (CNGA1-CNGA4) y dos subunidades tipo B (CNGB1 y CNGB3) (Zufall y col., 1997; Strijbos y col., 1999; Bradley y col., 2005). Cuatro de estas subunidades, iguales o diferentes, se agrupan para formar las estructuras tetraméricas funcionales (Liu y col., 1996; Biel y col., 1998; Wei y col., 1998) (fig 19).

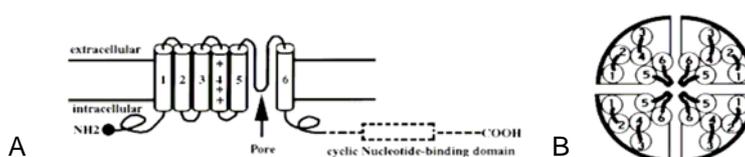


Figura 19. Representación esquemática de la estructura de los canales iónicos activados por la unión de nucleótidos cíclicos (CNG). A; Organización de una subunidad de los CNG. B; Organización tetramérica de los CNG. *Imagen modificada de Wei y col., 1998.*

Las subunidades CNGA1, CNGA2 y CNGA3 pueden formar canales homoméricos funcionales, mientras que las subunidades CNGA4, CNGB1 y CNGB3 no. Éstas últimas, sólo pueden dar canales funcionales uniéndose a las subunidades CNGA1, CNGA2 y/o CNGA3 (Zufall y col., 1997; Richards y Gordon, 2000; Kaupp y Seifert, 2002). Aunque algunas subunidades pueden formar canales homoméricos en las células, generalmente existen y funcionan como complejos hetero-oligoméricos (Dhallan y col., 1990; Bradley y col., 1994; Kaupp, 1995; Bonigk y col., 1999; Strijbos y col., 1999).

Cada subunidad de los CNG está formada por 6 dominios transmembrana (fig 19A). Se ha identificado un dominio de unión de nucleótidos en el extremo C-terminal (Goulding y col., 1994; Kaupp y col., 1998) y se ha visto que la región del extremo N-terminal tiene un papel importante en la activación alostérica y en la modulación de la función de los CNG (Goulding y col., 1994; Varnum y Zagotta, 1996, 1997; Gordon y col., 1997; Tibbs y col., 1997; Wei y col., 1998). Estos CNG son activados directamente por la unión de GMPc o AMPc al dominio del extremo C-terminal. Se ha visto que todos los CNG pueden ser activados indistintamente por la unión de GMPc o AMPc, aunque la mayor o menor afinidad por uno u otro de los dos nucleótidos depende de las distintas combinaciones de subunidades utilizados para dar el canal (Zufall y col., 1997).

La activación de los CNG implica dos pasos distintos (Biel y col., 1998; Wei y col., 1998): la unión del nucleótido cíclico al sitio de unión en la región C-terminal y la posterior apertura del poro del canal. Estos canales suponen un lugar de entrada masiva de Ca^{2+} por un mecanismo independiente del cambio de voltaje en la membrana y que sólo depende de la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos (Gray-Keller y Detwiler, 1994; Frings y col., 1995; Leinders-Zufall y col., 1995, 1997; Bradley y col., 1997; Zufall y col., 1997; Biel y col., 1998; Strijbos y col., 1999). A pesar de que los CNG dejan pasar cationes monovalentes como el Na^+ , tienen mucha mayor permeabilidad para el Ca^{2+} .

En el sistema nervioso central, se ha demostrado que los CNG tienen un papel importante tanto durante en el desarrollo como en el funcionamiento normal del cerebro adulto (Zufall y col., 1997). Se ha propuesto que los CNG pueden tener un papel importante en procesos de plasticidad sináptica (Ahmad y col., 1994; Kingston y col., 1996, 1999; Bradley y col., 1997; Zufall y col., 1997), como guía durante el crecimiento axonal (Zufall y col., 1997; Wei y col., 1998) y que pueden regular la liberación de algunos neurotransmisores (Rieke y Schwartz, 1994; Zufall y col., 1997). Además, algunos autores (Ahmad y col., 1994; Leinders-Zufall y col., 1995, 1996; Broillet y Firestein, 1996; Zufall y Leinders-Zufall, 1997) describen a los CNG como importantes dianas para la actuación de mensajeros gaseosos, como el óxido nítrico o el monóxido de carbono en sus vías de señalización mediadas por GMPc, proporcionando de esta manera un mecanismo por el cual estos mensajeros pueden cambiar los niveles de Ca^{2+} en el interior de las neuronas.

Muchos estudios han mostrado una amplia distribución de la expresión de algunos CNG en el sistema nervioso central, incluyendo regiones como el hipocampo, el cerebelo, el córtex o el bulbo olfatorio principal (Ahmad y col., 1994; El-Husseini y col., 1995; Leinders-Zufall y col., 1995; Kingston y col., 1996; Bradley y col., 1997; Ding y col., 1997; Thompson, 1997; Wei y col., 1998). En el bulbo olfatorio principal se ha descrito, mediante métodos de hibridación *in situ*, la presencia de las subunidades CNGA2 (El-Husseini y col., 1995; Kingston y col., 1996, 1999; Bradley y col., 1997), y CNGA3 (Strijbos y col., 1999). Las subunidades de CNGA2 se ha visto que aparecen en células juxtaglomerulares, en las células empenachadas de la capa plexiforme externa, en células mitrales y en células granulares (Kingston y col., 1999). En el estudio realizado por Kingston y col. (1999), se hizo una descripción exhaustiva de la presencia de esta subunidad en todo el cerebro, sin hacer mención alguna a su posible relación con la vía de transducción del óxido nítrico a través de la GCs mediante la producción de GMPc. La subunidad de CNGA3 aparece distribuida en todo el bulbo olfatorio principal, siendo especialmente intensa su expresión en la capa de las células mitrales (Strijbos y col., 1999).

Además de estos CNG, en mamíferos existe una subfamilia específica de canales iónicos que también se abren por la unión de nucleótidos cíclicos pero que sólo son funcionales cuando la célula está hiperpolarizada: son los canales catiónicos no selectivos abiertos por nucleótidos cíclicos y activados por hiperpolarización (HCN) (Ludwig y col., 1998; Santoro y col., 1998; Ishii y col., 1999; Seifert y col., 1999). Para estos canales, existen 4 genes que codifican para 4 subunidades diferentes (HCN1-HCN4) (Ludwig y col., 1998, 1999; Santoro y col., 1998; Kaupp y Seifert, 2001). Algunos estudios proponen que las diferentes subunidades se unen para formar heteromultímeros funcionales (Ludwig y col., 1998; Santoro y col., 1998; Moosmang y col., 1999; Franz y col., 2000; Biel y col., 2002) y es la composición final del canal lo que le otorga sus propiedades funcionales, su cinética y su mayor o menor afinidad por los diferentes nucleótidos cíclicos (Ludwig y col., 1998; Moosmang y col., 2001; Holderith y col., 2003; Müller y col., 2003). Los HCN conducen tanto K^+ como Na^+ , pero no son selectivos; además, al contrario de lo que sucedía con los CNG, no dejan pasar cationes divalentes como el Ca^{2+} (Biel y col., 2002). Las subunidades de los canales HCN tienen una estructura muy similar a la estructura de las subunidades de los CNG. Cada subunidad consiste, como hemos visto para los CNG, en 6 dominios transmembrana con un sitio de unión para los nucleótidos cíclicos situado en la región del extremo C-terminal de cada subunidad (Santoro y col., 1998, 2000; Ludwig y col., 1999; Biel y col., 2002; Robinson y Siegelbaum, 2003). La activación de los HCN depende de una hiperpolarización de la membrana plasmática de la neurona y su apertura requiere la unión de un nucleótido cíclico al dominio regulador del extremo C-terminal (Biel y col., 2002). Aunque se ha visto que es el AMPc el que normalmente se une al dominio regulador del extremo C-terminal de los HCN, se ha demostrado que estos canales

también son sensibles a GMPc, aunque en estos casos se requiere una concentración casi 100 veces mayor de GMPc que de AMPc para producir la misma función (Ludwig y col., 1998; Biel y col., 2002).

Estudios de hibridación *in situ* y de localización inmunohistoquímica han demostrado que las cuatro subunidades de HCN son expresadas, con distinto patrón de distribución, en el cerebro de rata (Santoro y col., 1997, 1998, 2000; Ludwig y col., 1998; Moosmang y col., 1999; Monteggia y col., 2000; Bender y col., 2001; Brewster y col., 2002; Lorincz y col., 2002; Vasilyev y Barish y col., 2002; Holderith y col., 2003; Notomi y Shigemoto, 2004). En alguno de estos estudios se ha demostrado, además, la presencia de HCN1, HCN2, HCN3 y HCN4 en el bulbo olfatorio principal. El marcaje de HCN1 aparece en procesos dendríticos y en somas celulares de la capa de los glomérulos olfatorios, habiendo sido descrito, principalmente, en células periglomerulares (Holderith y col., 2003; Notomi y Shigemoto, 2004). La marca para HCN2 con inmunocitoquímica es difusa en la capa de los glomérulos olfatorios y abundante en la capa plexiforme externa; en la capa plexiforme interna, aparece un marcaje axonal (Notomi y Shigemoto, 2004). El marcaje para HCN4 aparece especialmente intenso en la capa plexiforme externa (Notomi y Shigemoto, 2004).

2.2.2.1.2. *Proteínas kinasas dependientes de GMPc*

Las proteínas kinasas dependientes de GMPc (PKG) son el principal mediador de señales intracelulares mediadas por GMPc; de hecho, hasta hace pocos años se pensaba que las PKG eran los únicos efectores primarios de este nucleótido cíclico en los procesos fisiológicos (Kuo y Greengard, 1969; Krebs y Beavo, 1979; Walter, 1989; Hofmann y col., 1992; Butt y col., 1993; Francis y Corbin, 1994; Wang y Robinson, 1997). Las PKG ejercen su función mediante la fosforilación de sus sustratos (El-Husseini y col., 1995; Wang y Robinson, 1997). Entre sus funciones, se ha visto que regulan la agregación plaquetaria, la relajación del músculo liso, la secreción de fluidos en el intestino, y el crecimiento de las dendritas apicales de células corticales en el cerebro (Francis y Corbin, 1994; French y col., 1995; Pfeifer y col., 1996; Lohmann y col., 1997; Wagner y col., 1998; Hedlund y col., 2000; Polleux y col., 2000).

En mamíferos existen dos genes que codifican para dos PKG diferentes que, aunque estructuralmente son similares, difieren en su localización subcelular, en la distribución en los tejidos, en la afinidad por los nucleótidos cíclicos, en la especificidad de los sustratos y en su función dentro de las células (Gamm y col., 1995; Lohmann y col., 1997; Vaandrager y col., 1997). Las dos PKG, llamadas PKG1 y PKG2, son dímeros formados por la unión de dos subunidades idénticas donde, en cada subunidad, puede encontrarse un dominio regulador y otro catalítico (Francis y col., 1996; Herberg y col., 1996).

La PKG1 es una proteína citosólica (Vaandrager y col., 1996; Lohmann y col., 1997). Debido a un *splicing* alternativo de su ARNm, se han encontrado dos isoformas diferentes,

PKG1 α y PKG1 β , que únicamente difieren en 100 aminoácidos que se encuentran formando el extremo N-terminal de la enzima (Wolfe y col., 1989; Orstavik y col., 1997). Se ha descrito la presencia de PKG1 en músculo liso, pulmones, plaquetas, células endoteliales, miocitos y sistema nervioso central. Dentro del sistema nervioso central, se ha descrito en retina, cerebelo, en la raíz del ganglio dorsal, en las neuronas espinosas del estriado, en el bulbo olfatorio, en hipocampo, núcleo supraquiasmático, hipotálamo, tracto trigémino espinal, tracto solitario y área postrema de la médula espinal, órgano subcomisural, corteza cerebral, amígdala y núcleo habenular lateral (Kuo, 1975; Lohmann y col., 1981 y 1997; Walter, 1981; Gamm y col., 1995 y 2000; El-Husseini y col., 1995, 1998, 1999; Qian y col., 1996; Wang y Robinson, 1997; Francis y col., 1998; Smolenski y col., 1998; Gudi y col., 1999; Arancio y col., 2001; Revermann y col., 2002; Kleppisch y col., 2003; Snellman y Nawy, 2004; Feil y col., 2005). Parte de estos estudios de distribución se realizaron utilizando un anticuerpo para detectar ambas isoformas de la PKG1. En un trabajo de 2005, Feil y col. han visto una distribución preferencial de las dos isoformas de la PKG1 en distintas zonas del sistema nervioso central; mientras que la PKG1 α se encuentra preferentemente en el cerebelo y en la médula espinal, la PKG1 β se encuentra principalmente en hipocampo, amígdala, hipotálamo y bulbo olfatorio.

La PKG2 es una proteína que se encuentra anclada a membrana por su extremo N-terminal. Se ha visto en las células de la mucosa intestinal, en pulmón, riñón, hígado, huesos, células epiteliales y cerebro. En el cerebro se ha demostrado su presencia en el cerebelo, habénula medial, septo, amígdala, bulbo olfatorio, tálamo, núcleo subtalámico, locus ceruleus, núcleo pontino, núcleo de la oliva inferior y núcleo del tracto solitario (Uhler, 1993; El-Husseini y col., 1995, 1998; Qian y col., 1996; Lohmann y col., 1997; Vaandrager y col., 1997; Wang y Robinson, 1997). En estas regiones cerebrales se ha descrito tanto en el soma de algunas neuronas, como en oligodendrocitos y en astrocitos. Sin embargo, su lugar principal de distribución son zonas de neuropilo, sugiriendo esto un papel clave de esta proteína en la transmisión sináptica (Vaandrager y col., 1996; De Vente y col., 2001; Jurado y col., 2004). La amplia distribución que presentan las PKG en el cerebro sugiere que podrían tener un papel importante en la señalización del óxido nítrico en el sistema nervioso central.

2.2.2.1.3. Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos

Las fosfodiesterasas de los nucleótidos cíclicos (PDE) son un grupo de enzimas estructuralmente emparentadas que catalizan la hidrólisis de nucleótidos monofosfato cíclicos a nucleótidos monofosfato mediante un corte del puente fosfodiéster entre los átomos de fósforo y oxígeno en la posición 3' (fig 18) (Turko y col., 1998; Murthy, 2001). De esta forma, las PDE controlan la duración y la amplitud de la señal mediada por nucleótidos cíclicos en las células (Juifls y col., 1999; Rybalkin y col., 2002).

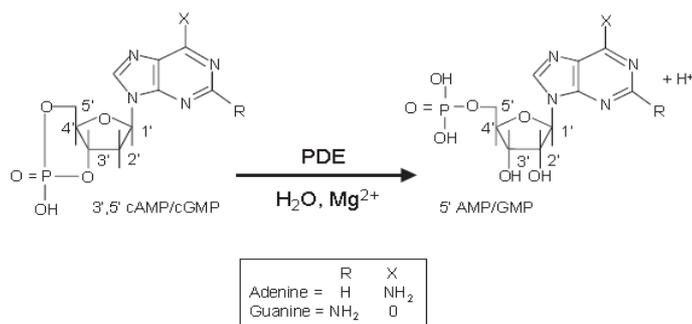


Figura 18. Hidrólisis de los nucleótidos cíclicos (GMPc y AMPc) catalizada por las fosfodiesterasas (PDE). Imagen modificada de Lugnier, 2006.

Hasta el momento se conocen 11 familias de fosfodiesterasas diferentes (PDE1-PDE11), y muchas de estas familias presentan distintas isoformas debido al *splicing* alternativo que sufren sus ARNm (Murthy, 2001; Bender y Beavo, 2004). Todas las familias presentan un dominio catalítico muy conservado próximo al extremo C-terminal, una región par reguladora y la región N-terminal, que es la que le confiere su especificidad por uno de los dos nucleótidos cíclicos (Houslay, 2001; Conti y col., 2003; Houslay y Adams, 2003; Houslay y col., 2005). Las 11 familias de PDE se pueden agrupar en tres grupos en función de su especificidad por los distintos nucleótidos cíclicos:

- 1) Las que específicamente hidrolizan AMPc: PDE4, PDE7 y PDE8.
- 2) Las que específicamente hidrolizan GMPc: PDE5, PDE6 y PDE9.
- 3) Las que hidrolizan tanto AMPc como GMPc: PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 y PDE11.

Existen diferencias en la distribución concreta de las diferentes familias a nivel de tejidos y células y en su localización subcelular. A nivel subcelular, las diferentes PDE pueden encontrarse en el citosol, en la membrana plasmática o en el citoesqueleto (Houslay y col., 1998; Nyby y col., 2003). Esta localización subcelular específica contribuye a una señalización también específica y compartimentalizada de los nucleótidos cíclicos dentro de la célula (Houslay y Milligan, 1997; Cheng y Grande, 2007). Se ha visto que una gran variedad de familias de PDE se expresan en el cerebro de mamíferos y que presentan, además, un patrón de localización diferente (Repaske y col., 1993; Furuyama y col., 1994; Yan y col., 1994; Beavo, 1995; Kotera y col., 1997; Fujishige y col., 1999; Fawcett y col., 2000; Soderling y Beavo, 2000; Andreeva y col., 2001; Francis y col., 2001; Bender y Beavo, 2004). La expresión de las familias de PDE dependientes de GMPc en el cerebro está muy poco estudiada, pero se ha visto que es muy específica, encontrándose en muy pocas neuronas de regiones concretas (Bender y Beavo, 2004).

De las 11 familias de PDE descritas hasta el momento, la PDE5 es la que tiene mayor interés para la vía de señalización del óxido nítrico en el cerebro por diferentes razones. La primera de ellas es que la PDE5 es una de las familias que hidroliza GMPc de forma específica. La segunda es que en algunos estudios se ha detectado la presencia de ARNm de la PDE5 en las células de Purkinje del cerebelo (Kotera y col., 1997, 2000; Juilfs

y col., 1999; Giordano y col., 2001; Van Staveren y col., 2003), en áreas corticales, hipocampo y bulbo olfatorio principal (Van Staveren y col., 2003). Hay que tener en cuenta que las dos regiones cerebrales con mayor producción de óxido nítrico por parte de la nNOS son el cerebelo y el bulbo olfatorio principal. Por último, estudios realizados por diferentes autores (Turko y col., 1998, 1999; Corbin y col., 2000, 2006; Murthy, 2001; Okada y Asakawa, 2002; Rybalkin y col., 2002; Mullershausen y col., 2003) sugieren que la PKG es el mayor regulador de la fosforilación de la PDE5 y, por tanto de su actividad; la PKG, como se comentaba en el apartado 2.2.2.1.1., también está íntimamente relacionada con la señalización por óxido nítrico.

La PDE5 es una enzima citosólica homodimérica; cada monómero cuenta con dos dominios reguladores alostéricos donde se unen dos GMPc, y un dominio catalítico donde se producirá la hidrólisis de GMPc a GMP (Loughney y col., 1998; Corbin y Francis, 1999; Fink y col., 1999; Turko y col., 1999; Corbin y col., 2000, 2006; Okada y Asakawa, 2002). En un principio se creía que la actividad enzimática de la PDE5 requería la presencia de dos moléculas de GMPc unidas a los sitios reguladores alostéricos y además la fosforilación de la enzima por parte de la PKG (Turko y col., 1998, 1999; Fink y col., 1999; Corbin y col., 2000; Murthy, 2001). Sin embargo, en los últimos años se ha visto que la actividad enzimática de la PDE5 está específicamente activada por la unión de los GMPc en los sitios reguladores alostéricos (Okada y Asakawa, 2002) aunque esta activación se ve facilitada si es fosforilada por parte de la PKG1 (Mullershausen y col., 2003). Este incremento en la actividad enzimática de la PDE5 inducida por la fosforilación producida por PKG1 representa un importante mecanismo de retroalimentación para limitar la amplitud y la duración de la señal de GMPc (Mullershausen y col., 2003).

Estudios previos de hibridación *in situ* han demostrado la presencia de PDE5 en el bulbo olfatorio principal. A pesar de que se ha visto que la PDE5 aparece en la capa plexiforme externa, en la capa de las células granulares y, con mayor intensidad de tinción, en la capa de las células mitrales, no se ha descrito en qué elementos celulares aparece (Van Staveren y col., 2003).

2.2.2.2. **Vía de la nitrosilación de proteínas**

En muchos casos se ha demostrado que la señalización producida por óxido nítrico en las neuronas es independiente de la vía que conlleva la producción de nucleótidos cíclicos y utiliza otras vías alternativas (Stamler y col., 1992; Lipton y col., 1993; Stamler, 1994). Una de estas vías alternativas es la acción directa del óxido nítrico sobre los residuos tiol de las cisteínas o las tirosinas de algunas proteínas (Stamler y col., 1992; Butler y col., 1995). Esta reacción producida entre el óxido nítrico y un grupo tiol para formar una unión tipo S-ON es lo que se conoce con el nombre de S-nitrosilación (Stamler y col., 1992; Lipton, 1999; Broillet, 1999; Gaston y col., 2003). De las especies reactivas del óxido nítrico (ON^{\cdot} , ON^- , ON^+), ON^+

es el agente nitrosilante más común (Broillet, 1999; Lipton, 1999; Nelson y col., 2003; Guix y col., 2005). Se ha demostrado que para que se produzca la reacción de S-nitrosilación se requiere una concentración de óxido nítrico mayor que la necesaria para activar la GCs (Ahern y col., 2002).

Algunos estudios realizados (Mirza y col., 1995; Catani y col., 1998; de la Torre y col., 1998) sugieren que los tioles de los residuos de cisteína de las proteínas son las principales dianas de la S-nitrosilación realizada por el óxido nítrico. Al nitrosilarse, las proteínas pueden modificar su función (Stamler y col., 2001; Martínez-Ruiz y Lamas, 2004) de modo que causan un efecto en las células que las contienen. Por ejemplo, en el caso de que la proteína nitrosilada sea una enzima, la S-nitrosilación puede provocar su activación o su desactivación, dependiendo de la enzima que sea (Lander y col., 1997; Lipton y col., 1998; Mannick y col., 1999; Pérez-Mato y col., 1999; Haendeler y col., 2002; Nelson y col., 2003); aquí es donde radica la importancia de esta vía de actuación. Sin embargo, el análisis de la existencia de S-nitrosilación en muchas proteínas demuestra que no todas las proteínas que presentan cisteínas con grupos tiol libres son S-nitrosiladas por óxido nítrico (Lander y col., 1995; Pérez-Mato y col., 1999; Sun y col., 2001). Al contrario, este fenómeno sólo afecta a los grupos tiol de proteínas concretas que contienen una región específica en su secuencia de aminoácidos dispuesta alrededor de una cisteína (Stamler y col., 1997; Xu y col., 1998; Lipton, 1999; Sun y col., 2001; Haendeler y col., 2002); esta secuencia específica de aminoácidos es la que aumenta la susceptibilidad de la cisteína a ser S-nitrosilada. Además, aunque en estudios *in vitro* se ha visto que más de un centenar de proteínas son susceptibles de ser S-nitrosiladas, de éstas, se ha demostrado que sólo unas pocas son S-nitrosiladas *in vivo* (Stamler y col., 2001; Martínez-Ruiz y Lamas, 2004). Las proteínas que sufren S-nitrosilación pueden estar formando parte de las membranas, estar libres en el citosol o encontrarse en el espacio extracelular (Gaston y col., 1993; Lipton, 1999; Rafikova y col., 2002).

Algunos autores han propuesto la S-nitrosilación como un mecanismo de modificación de proteínas análogo a la fosforilación y a la glicosilación (Butler y col., 1995; Lander y col., 1997). Se diferencia de estos dos, sin embargo, en que la S-nitrosilación no consiste en una modificación catalizada por una enzima que se expresa en una población determinada de células, sino en la modificación que pueda inducir un agente como el óxido nítrico que difunde libremente a través del tejido. Además, la modificación depende de una reacción puramente química entre el agente nitrosilante (generalmente NO^+) y la proteína diana (Stamler y col., 2001; Mannick y col., 2002). Por lo tanto, este proceso de S-nitrosilación puede cambiar en función de la concentración de los reactivos y del estado del sistema redox (Foster y col., 2003).

Algunos de los candidatos que presentan la secuencia de aminoácidos específicos antes mencionada y que son, por tanto, susceptibles de ser modificados por S-nitrosilación en el sistema nervioso central son (Lipton, 1999):

- canales iónicos (NMDA y CNG entre otros)
- transportadores (Ca-ATPasa; transportadores de K⁺)
- receptores (receptores del inositol trifosfato; el receptor del factor de crecimiento del nervio)
- enzimas (como las GC, NOS y algunas kinasas)
- moléculas y sustratos de adhesión celular
- ciclinas

Se ha visto que los CNG pueden estar directamente activados por óxido nítrico mediante S-nitrosilación, sin la necesidad de unión de nucleótidos cíclicos (Broillet y Firestein, 1996, 1997); esto proporcionaría una ruta alternativa por la cual el óxido nítrico puede regular la actividad eléctrica de la célula a través de estos canales, pero sin necesidad de producir GMPc (Ahern y col., 2002). Este es un claro ejemplo de las complejas interrelaciones que pueden existir entre las distintas vías de actuación del óxido nítrico.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

Desde que se descubrió que el óxido nítrico tiene funciones neuromoduladoras muy similares a las de otros neurotransmisores, se le han atribuido múltiples funciones en el sistema nervioso central. Se ha visto, por ejemplo, que su presencia y participación es necesaria para el correcto funcionamiento de los circuitos neuronales o que está implicado en la modulación de fenómenos de plasticidad neuronal y neurogénesis, en concreto en fenómenos de proliferación y migración celular. Estudiar el papel del óxido nítrico en el bulbo olfatorio tiene un triple interés. En primer lugar, el bulbo olfatorio principal es la región del cerebro con mayor número de neuronas productoras de óxido nítrico junto con el cerebelo. Además, el bulbo olfatorio principal tiene una organización laminar que lo convierte en un modelo muy sencillo y útil para estudiar circuitos neuronales. En segundo lugar, el bulbo olfatorio es un área cerebral donde existe un enorme nivel de plasticidad neuronal, ya que se produce una constante renovación de las células receptoras de los olores, cuyos axones han de establecer nuevas relaciones sinápticas en el interior de los glomérulos olfatorios. En tercer lugar, el bulbo olfatorio principal es el destino de las nuevas neuronas que se están generando en la zona subventricular y que viajan por la corriente migratoria rostral. Estas células han de incorporarse *de novo* a los circuitos del bulbo olfatorio y para ello han de establecer correctamente las conexiones que efectúan tanto sus dendritas como sus axones. Tomando todo esto en consideración, podemos pensar que el óxido nítrico debe desempeñar funciones muy diversas en el bulbo olfatorio principal. Algunas de estas funciones podrían tener que ver con el procesamiento de la información que allí tiene lugar, mientras que otras podrían estar relacionadas con la plasticidad neuronal.

A pesar de todo esto, no existen estudios dirigidos a analizar en detalle el papel del óxido nítrico en esta región. Conociendo la implicación funcional del óxido nítrico en el bulbo olfatorio principal, podríamos conocer datos más generales que nos permitan inferir cuáles son las implicaciones funcionales del óxido nítrico en el resto del sistema nervioso central. Esta última razón es el fin último que motiva nuestras investigaciones. Como primer paso, en este trabajo nos proponemos detallar cuáles son las dianas y los mecanismos de actuación del óxido nítrico en el bulbo olfatorio principal. Para ello, vamos a analizar, por un lado, la acción del óxido nítrico en los circuitos neuronales. Haremos especial énfasis en los circuitos dopaminérgicos, porque se ha visto que el óxido nítrico está directamente relacionado con la transmisión dopaminérgica. Por otro lado, analizaremos la relación del óxido nítrico con las células implicadas en los procesos de neurogénesis adulta, en concreto con las células de la corriente migratoria rostral.

Para llevar a cabo este trabajo, nos planteamos dos grandes objetivos:

1. Analizar las posibles vías de actuación del óxido nítrico en los circuitos del bulbo olfatorio principal. Para la consecución de este objetivo general, nos planteamos otros más concretos:

1.1 Determinar sobre qué elementos del bulbo olfatorio principal actúa el óxido nítrico a través de la activación de la enzima GCs.

- 1.2 Determinar, en la medida de lo posible, la ruta de señalización intracelular del óxido nítrico en las células que expresan GCs.
- 1.3 Determinar sobre qué elementos del bulbo olfatorio principal actúa el óxido nítrico a través de la nitrosilación de proteínas.
- 1.4 Determinar si existe alguna relación entre los circuitos nitrérgicos y dopaminérgicos.

2. Analizar las posibles vías de actuación del óxido nítrico en las células de la corriente migratoria rostral. Para la consecución de este objetivo general, nos planteamos otros más concretos:

- 2.1 Determinar sobre qué elementos de la corriente migratoria rostral actúa el óxido nítrico a través de la activación de la enzima GCs.
- 2.2 Determinar la ruta de señalización intracelular del óxido nítrico en las células que expresan GCs.
- 2.3 Determinar si el óxido nítrico actúa sobre las células de la de la corriente migratoria rostral nitrosilando proteínas.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Como animales de experimentación se han utilizado ratas albinas adultas de la cepa Wistar. Los animales utilizados fueron indistintamente machos y hembras con dos meses y medio de edad y un peso que oscilaba entre los 200 y los 250 gramos. Los animales fueron mantenidos en condiciones idóneas en el estabulario del centro; el traslado al laboratorio se produjo dos días antes de su sacrificio para reducir, en la medida de lo posible, cualquier situación de estrés que posteriormente pudiera interferir en los resultados obtenidos. Todos los animales utilizados fueron animales control. En algún experimento concreto se utilizaron animales tratados con 200 mg/Kg de 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, Sigma; inyectada intraperitonealmente 2 horas antes del sacrificio del animal). El cuidado y la manipulación de los animales ha seguido la normativa europea (European Communities Council Directive (86/609/EEC)) y la legislación española vigente (Real Decreto 1201/2005) sobre experimentación animal.

4.2. ANTICUERPOS

En la siguiente tabla se recogen todos los anticuerpos primarios utilizados en los métodos de detección inmunocitoquímica realizados, cuál es su origen, la concentración a la que fueron usados y la casa comercial o el laboratorio que los proporcionó.

ABC: detección inmunocitoquímica con el complejo ABC (avidina-biotina-peroxidasa); F: detección inmunocitoquímica con marcadores fluorescentes; Au: detección inmunocitoquímica con partículas de oro coloidal

Antígeno	Anticuerpo	Concentración	Casa comercial
Ácido gamma-aminobutírico (GABA)	IgG de conejo anti-GABA Origen policlonal	1:5000 (ABC) 1:2000 (F) 1:2500 (Au)	Chemicon/Sigma Swant
	IgG de ratón anti-GABA Origen monoclonal	1:5000 (ABC) 1:1000 (F)	Swant
Tirosina hidroxilasa (TH)	IgG de ratón anti-TH Origen monoclonal	1:3000 (ABC) 1:1000 (F)	Chemicon
Isoforma neuronal de la sintasa del óxido nítrico (nNOS)	IgG de ratón anti-nNOS Origen monoclonal	1:3000 (ABC) 1:500 (F)	Sigma
Colecistoquinina (CCK)	IgG de ratón anti-CCK Origen monoclonal	1:5000 (ABC) 1:2000 (F)	CURE/ Digestive Disease Research Center Antibody/RIA Core
Somatostatina (SOM)	IgG de conejo anti-SOM Origen policlonal	1:3000 (ABC) 1:1000 (F)	Dr. T.J. Göracs
Calbindina D28k (CB)	IgG de conejo anti-CB Origen policlonal	1:10000 (ABC) 1:8000 (F)	Sigma
	IgG de ratón anti-CB Origen monoclonal	1:10000 (ABC) 1:7000 (F)	Sigma Swant
Calretinina (CR)	IgG de conejo anti-CR Origen policlonal	1:10000 (ABC) 1:8000 (F)	Swant
	IgG de ratón anti-CR Origen monoclonal	1:10000 (ABC) 1:8000 (F)	Swant

Parvalbúmina (PV)	IgG de conejo anti-PV Origen policlonal	1:8000 (ABC)	Swant
	IgG de ratón anti-PV Origen monoclonal	1:3000 (F)	
Subunidad β 1 de la Guanilato ciclasa soluble (β 1-GCs)	IgG de conejo anti-GCs Origen policlonal	1:3000 (ABC) 1:1000 (F)	Cayman
Subunidad α 1 de la Guanilato ciclasa soluble (α 1-GCs)	IgG de conejo anti-GCs Origen policlonal	1:3000 (ABC)	Sigma
Proteína gliofibrilar ácida (GFAP)	IgG de conejo anti-GFAP Origen policlonal	1:2000 (ABC) 1:500 (F)	Sigma
	IgG de ratón anti-GFAP Origen monoclonal	1:3000 (ABC) 1:2000 (F)	Sigma
5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU)	IgG de rata anti-BrdU Origen policlonal	1:1000 (F)	Immunological direct
	IgG de ratón anti-BrdU Origen monoclonal	1:200 (F)	Novacastra
Doblecortina (DCX)	IgG de cabra anti-DCX Origen policlonal	1:100 (F)	Santa Cruz
Receptor D2 de dopamina (RD2)	IgG de conejo anti-RD2 Origen policlonal	1:200 (Au)	Chemicon
Subunidad 1 de los canales activados por nucleótidos cíclicos en condiciones de hiperpolarización (HCN1)	IgG de conejo anti-HCN1 Origen policlonal	1:400 (ABC) 1:250 (F) 1:300 (Au)	Alomone
Subunidad 2 de los canales activados por nucleótidos cíclicos en condiciones de hiperpolarización (HCN2)	IgG de conejo anti-HCN2 Origen policlonal	1:200 (ABC) 1:150 (F) 1:200 (Au)	Alomone
Subunidad 4 de los canales activados por nucleótidos cíclicos en condiciones de hiperpolarización (HCN4)	IgG de conejo anti-HCN4 Origen policlonal	1:400 (ABC) 1:200 (F) 1:300 (Au)	Alomone
Subunidad A2 de los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGA2)	IgG de conejo anti-CNGA2 Origen policlonal	1:500 (ABC) 1:250 (F) 1:300 (Au)	Alomone
Subunidad A3 de los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGA3)	IgG de conejo anti-CNGA3 Origen policlonal	1:1000 (ABC) 1: 500 (F) 1:1000 (Au)	Alomone
Fosfodiesterasa 5 (PDE5)	IgG de conejo anti-PDE5 Origen policlonal	1:300 (ABC)	Fab Gennix Inc
Fosfodiesterasa 5 fosforilada (P-PDE5)	IgG de conejo anti-P-PDE5 Origen policlonal	1:300 (ABC) 1:200 (Au)	Fab Gennix Inc
Proteín kinasa dependiente de GMPc de tipo 2 (PKG2); extremo C-terminal	IgG de conejo anti-PKG2 Origen policlonal	1:100 (ABC)	Abgent
Proteín kinasa dependiente de GMPc de tipo 2 (PKG2); extremo N-terminal	IgG de cabra anti-PKG2 Origen policlonal	1:100 (ABC)	Santa Cruz
Proteín kinasa dependiente de GMPc de tipo 1 β (PKG1 β)	IgG de conejo anti-PKG1 β Origen policlonal	1:800 (ABC)	Stressgen
Dopamina nitrosilada (NO-DA)	IgG de rata anti-NO-DA Origen policlonal	1:1000 (ABC)	Advanced Targeting Systems
Cisteína nitrosilada (NO-L-Cys)	IgG de rata anti-NO-L-Cys Origen policlonal	1:1000 (ABC)	Advanced Targeting Systems

En la siguiente tabla se detallan los anticuerpos secundarios utilizados, la marca, la concentración a la que han sido utilizados y la casa comercial proveedora.

Anticuerpo	Marca	Concentración	Casa comercial
IgG de burro anti-IgG de cabra	Alexa 488	1:400	Jackson
IgG de burro anti-IgG de conejo	Alexa 488	1:400	Jackson
IgG de burro anti-IgG de ratón	Alexa 488	1:400	Jackson
IgG de burro anti-IgG de cabra	Alexa 555	1:400	Jackson
IgG de burro anti-IgG de conejo	Alexa 555	1:400	Jackson
IgG de burro anti-IgG de ratón	Alexa 555	1:400	Jackson
IgG de burro anti-IgG de ratón	Cy2	1:400	Jackson
IgG de burro anti-IgG conejo	Cy3	1:400	Jackson
IgG de cabra anti-IgG de conejo	Au (Ø 10nm)	1:15	Sigma
IgG de cabra anti-IgG de conejo	Au (Ø 1nm)	1:100	Amersham
IgG de cabra anti-IgG de ratón	Au (Ø 10nm)	1:15	Sigma
IgG de cabra anti-IgG de ratón	Au (Ø 1nm)	1:100	Amersham
IgG de caballo anti-IgG de cabra	Biotina	1:200	Vector/Pierce
IgG de cabra anti-IgG de conejo	Biotina	1:200	Vector/Pierce
IgG de cabra anti-IgG de ratón	Biotina	1:200	Vector/Pierce
Fragmentos F(ab) de cabra anti-IgG de conejo		1:100	Jackson
Fragmentos F(ab) de cabra anti-IgG de ratón		1:100	Jackson

4.3. TAMPONES

Se han utilizado diferentes tampones para almacenar y lavar las secciones, para las diluciones de los reactivos en los distintos protocolos de tinción, de detección de antígenos por métodos inmunocitoquímicos o de detección de actividades enzimáticas por métodos histoquímicos.

Tampón Fosfato 0,1M pH 7,4 (TF)

Tampón Fosfato Salino 0,01M pH 7,4 (TFS)

Tampón Tris-HCl 0,05M pH 7,4 para 25°C (TT)

Tampón Tris-HCl 0,1M pH 8,0 para 25°C (TT₈₋₂₅)

Tampón Tris-HCl 0,1M pH 8,0 para 37°C (TT₈₋₃₇)

Tampón Tris-HCl Salino 0,05M pH 7,4 para 25°C (TTS)

4.4. EQUIPOS UTILIZADOS

4.4.1. Microtomía

La obtención de las secciones para su procesado y análisis se ha realizado con los siguientes equipos de microtomía:

- Vibratomo. Modelo VT 1000E de Leica.
- Ultramicrotomo. Modelo EM UC6 de Leica.
- Ultramicrotomo. Modelo ULTRACUTE de REICHERT & JUNG.
- Crioultramicrotomo. Modelo Leica Ultracut UCT

- Cuchillas de diamante para resina de 45° de DIATOME.
- Cuchillas de diamante para resina de 35° de DIATOME.
- Cuchillas de diamante para crioultramicrotomía de 35° de DRUKKER.

4.4.2. Microscopía

El análisis de las preparaciones se ha llevado a cabo utilizando distintos microscopios, adecuados en cada caso para analizar cada tipo de muestra.

- Microscopio Confocal. Modelo TCS SP de Leica. Equipado con los láseres Ar (458 y 488 nm), Ne-Ne (543 nm) y He-Ne (633 nm).
- Microscopio Electrónico de Transmisión. Modelo JEM 1010 de Jeol.
- Microscopio óptico convencional. Modelo CH30 de Olympus.
- Microscopio óptico convencional. Modelo CX41 de Olympus.
- Microscopio óptico equipado con epifluorescencia. Modelo BX51WI de Olympus.
- Lupa binocular Lan Optics.

4.4.3. Sistemas de captura de imagen

Las imágenes mostradas en este trabajo han sido obtenidas con los siguientes sistemas de captura de imagen.

- Cámara digital MegaViewIII de captura de imagen del microscopio electrónico de transmisión, de Soft Imagen System.
- Cámara digital modelo C-5050 de Olympus.
- Cámara digital modelo de C-5060 de Olympus.
- Sistema de fotografía convencional del microscopio electrónico de transmisión y placas fotográficas Kodak.

4.4.4. Programas de modificación-procesado de la imagen

Las imágenes mostradas en este trabajo han sido editadas con distintos programas de procesado de imagen.

- AnalySIS.
- IrfanView.
- Ulead PhotoImpact 5 Bundled Edition.
- Micrograph Picture.

4.5. PERFUSIÓN. OBTENCIÓN DE LAS SECCIONES FLOTANTES

Todos los animales utilizados en este estudio fueron sacrificados mediante perfusión intracardiaca y fijados con una mezcla de diferentes agentes fijadores; para la perfusión de los

animales se utilizó una bomba de perfusión peristáltica que permitió una fijación homogénea asegurando la llegada del fijador a todos los tejidos y células del animal.

Para proceder a la perfusión, los animales fueron profundamente anestesiados mediante la inyección intraperitoneal de una solución de hidrato de cloral al 4% en suero salino (cloruro sódico al 0,9% en agua). La dosis de anestésico inyectada fue de 1 ml por cada 100 gramos de peso del animal. Una vez comprobada la ausencia total de movimientos reflejos en el animal se accedió a la caja torácica del mismo y se introdujo por el ventrículo izquierdo del corazón una cánula conectada a la bomba de perfusión; posteriormente se realizó un corte en la aurícula derecha para permitir la salida de los fluidos (sangre, solución de lavado y mezcla de agentes fijadores).

Los animales se perfundieron primero con suero salino (20 ml) para eliminar la sangre del sistema circulatorio, evitando de esta manera la posible formación de coágulos y después con un volumen de 500 ml de la mezcla de agentes fijadores a una tasa de 15 ml por minuto. Las distintas mezclas de fijadores que se utilizaron fueron:

- Solución de perfusión 1: paraformaldehído al 4% en TF
- Solución de perfusión 2: glutaraldehído al 0,5% y paraformaldehído al 4% en TF
- Solución de perfusión 3: glutaraldehído al 1% y paraformaldehído al 2% en TF
- Solución de perfusión 4: 50 ml de acroleína al 3,8% y paraformaldehído al 2% en TF seguido de 450 ml de paraformaldehído al 2% en TF

La perfusión de los animales se realizó con una u otra solución de perfusión en función del uso del tejido. Los animales perfundidos con la Solución 1 se utilizaron para los análisis de patrones de distribución general de marcadores a microscopía óptica convencional y para los marcajes múltiples con fluorescencia. Los animales perfundidos con la Solución 2, la Solución 3 o con la Solución 4 se usaron para los análisis de microscopía electrónica. Además, el tejido de los animales fijados con las soluciones de perfusión 2 y 3 también fue utilizado cuando se procedió a la detección de GABA, NO-DA y NO-L-Cys para su análisis a microscopía óptica, debido a que los anticuerpos correspondientes utilizados reconocen GABA, NO-DA y NO-L-Cys unidos a glutaraldehído.

Una vez fijados los animales se procedió a la extracción de sus cerebros y a la disección de los bulbos olfatorios. Los bulbos olfatorios fueron encastrados en Agar (solución líquida de Agar tipo americano para bacteriología al 4% en agua) y cortados con el vibratomo en secciones coronales de 50 μ m. Las secciones flotantes obtenidas fueron recogidas y mantenidas en TF con azida sódica al 0,05% a 4°C hasta su posterior uso.

4.6. TINCIONES CON AZUL DE TOLUIDINA

Estas tinciones se realizaron para observar la citoarquitectura del bulbo olfatorio de la rata. Sus protocolos aparecen resumidos en el Anexo I.

4.6.1. Tinción de Nissl en cortes de vibratomo

Las tinciones se realizaron sobre secciones representativas de todos los niveles del bulbo olfatorio principal (desde los niveles más rostrales hasta los más caudales). Para la tinción, se montaron las secciones del bulbo olfatorio principal sobre portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar al aire. Después, se sumergieron en una solución de azul de toluidina al 0,5% en tampón acetato 0.1M pH 3,9 durante diez minutos y, acto seguido, la tinción se diferenció en etanol de 96°. Tras este paso, los cortes se deshidrataron con una batería de etanol de graduación creciente, se aclararon con xilol y se montaron con Eukitt.

4.6.2. Tinción de cortes semifinos con azul de toluidina-borax

Este protocolo se utilizó para teñir secciones semifinas de entre 0,5 y 2,0 μm obtenidas en un ultramicrotomo a partir de material incluido en resina Durcupan. El uso del borax, combinado con el calor (60°C), permite una corrosión parcial de la resina en la superficie del corte permitiendo así la adhesión del colorante al tejido sin tener que eliminar la resina antes de la tinción. La tinción de estos cortes sirve para controlar el nivel en el que nos encontramos cuando estamos obteniendo cortes ultrafinos para analizar a microscopía electrónica.

Los cortes semifinos recogidos se colocaron sobre gotas de agua colocadas en portaobjetos gelatinizados que se pusieron a secar sobre una placa calefactora a 60°C. Para la tinción, se colocó una gota de azul de toluidina-borax (azul de toluidina al 0,5% y tetraborato sódico al 1%) sobre el corte semifino y éste se puso alrededor de 15-30 segundos sobre la placa calefactora a 60°C. Tras la tinción, los cortes fueron lavados con abundante agua. Acto seguido fueron deshidratados por desecación en la placa calefactora y montados con una gota de Durcupan, que se polimerizó en estufa a 60°C durante 24 horas.

4.7. DETECCIÓN HISTOQUÍMICA DE LA NADPH-DIAFORASA

En tejidos animales fijados con aldehídos, la detección histoquímica de la actividad enzimática NADPH-diaforasa es una excelente herramienta para teñir de forma selectiva las células que contienen la enzima NOS (Alonso et al., 1995). Hemos utilizado esta técnica, por tanto, como herramienta para marcar las neuronas que sintetizan óxido nítrico. En la técnica histoquímica se utiliza como cromógeno azul de nitrotetrazolio (NBT), que es un compuesto prácticamente incoloro, soluble en soluciones acuosas y fácilmente reducible por la acción de la NADPH-diaforasa convirtiéndose en un compuesto de color azul intenso llamado formazán que no es soluble en soluciones acuosas y que precipita en las células donde se forma.

El protocolo de la NADPH-diaforasa aparece resumido en el Anexo I. Para realizar la detección histoquímica de la NADPH-diaforasa las secciones de vibratomo fueron bien lavadas en TT₈₋₂₅ y posteriormente incubadas en una mezcla de NBT (0,15 mg/ml), β -NADPH (1 mg/ml) y 0,3% Triton X-100 en TT₈₋₃₇ durante un tiempo variable de entre 60 y 90 minutos a 37°C y en

oscuridad. La reacción se controló bajo el microscopio y una vez se hubieron detectado las neuronas positivas, se paró lavando las secciones abundantemente con TT₈₋₂₅.

Sobre alguna de estas secciones se realizó posteriormente la detección inmunohistoquímica de algunos marcadores de interneuronas empleando para ello el método inmunohistoquímico del ABC (ver en el apartado 4.8.1.1.1. el protocolo de detección inmunohistoquímica simple mediante el método del ABC).

Parte de las secciones teñidas para NADPH-diaforasa fueron colocadas sobre portaobjetos gelatinizados, deshidratadas con una batería de etanol de gradación creciente, aclaradas con xilol y montadas con Eukitt. El resto fueron deshidratadas con una batería de etanol de gradación creciente, aclaradas con óxido de propileno e incluidas en plano en resina Durcupan entre un portaobjetos y un cubreobjetos.

4.8. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS

Las distintas técnicas inmunocitoquímicas que a continuación se detallan, se realizaron para visualizar los elementos del tejido que contenían y/o expresaban los antígenos recogidos en la tabla incluida en el apartado 4.2. La mayoría de estas técnicas emplean soluciones similares para realizar los lavados y las incubaciones con los anticuerpos; las principales soluciones utilizadas fueron:

a) **Solución de bloqueo.** La solución de bloqueo se utiliza para recubrir las zonas del tejido donde los anticuerpos se podrían unir de manera inespecífica dando un falso marcaje positivo. La solución de bloqueo se compone de glicina 0,2 M, lisina 0,2 M, albúmina de suero bovino (BSA) al 2%, gelatina de pescado (IGSS) al 0,1% y suero de la especie donde se haya obtenido el anticuerpo secundario (NGS, si la especie de donde se ha obtenido el anticuerpo secundario es cabra; NDS, si la especie es burro y NHS, si la especie es caballo) al 10% en TF o TFS.

b) **Solución de incubación.** La solución de incubación se utiliza para diluir los anticuerpos primarios y se compone de BSA al 0,8%, NGS o NDS o NHS al 5% y de IGSS al 0,1% en TF o TFS.

Cuando las soluciones de bloqueo y de incubación se utilizaron en inmunocitoquímicas destinadas únicamente para la microscopía óptica, tanto convencional como confocal, se les añadió de Triton X-100 al 0,1%, para permeabilizar el tejido y permitir la entrada de los anticuerpos. El uso de Triton X-100, sin embargo, no es compatible con el análisis del tejido a microscopía electrónica de transmisión, debido a la destrucción de las membranas, de manera que para permeabilizar el tejido que queremos estudiar a microscopía electrónica de transmisión se deben utilizar otras técnicas. El método elegido para permeabilizar los cortes destinados a inmunocitoquímica y microscopía electrónica de transmisión fue realizar una rápida congelación-descongelación del tejido. Para ello, las secciones fueron embebidas en una solución crioprotectora (sacarosa al 25% y glicerol al 10% en TF 0,05 M pH 7,4) durante una hora, tras lo

cual se procedió a realizar tres ciclos rápidos de congelación-descongelación sobre vapores de nitrógeno líquido. Inmediatamente después, las secciones fueron concienzudamente lavadas con TF para eliminar cualquier resto de la solución crioprotectora y se mantuvieron a 4°C en TF con azida sódica al 0,05% hasta su uso.

Cuando el tejido utilizado para realizar las detecciones inmunocitoquímicas había sido obtenido de los animales fijados mediante la Solución de perfusión 2 o mediante la Solución de perfusión 3, se procedió a la reducción de los grupos aldehído que pudieran haber quedado libres en el tejido para evitar así la fijación inespecífica de los anticuerpos. Para ello, antes de comenzar la técnica inmunocitoquímica, las secciones fueron incubadas con una solución de borohidruro sódico al 1% en TF durante 20 minutos a temperatura ambiente.

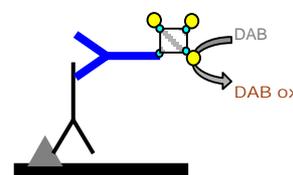
En este trabajo se han utilizado protocolos de detección inmunocitoquímica muy variados dependiendo del diseño de cada experimento. El esquema general que se siguió en la mayoría de ellos fue el siguiente: un paso de bloqueo de las secciones en la solución de bloqueo, un paso de incubación de las secciones con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de incubación, un paso de incubación de las secciones con los anticuerpos secundarios marcados y, cuando procedía (dependiendo del método utilizado), un paso de detección de la marca de los anticuerpos secundarios para visualizar así las células que presentaban el antígeno buscado. A continuación se detallan los diferentes protocolos inmunocitoquímicos utilizados en este trabajo. Todos ellos, además, aparecen resumidos en el Anexo I.

4.8.1. Marcajes inmunocitoquímicos simples

4.8.1.1. **Marcajes inmunocitoquímicos simples en preinclusión**

4.8.1.1.1. *Marcaje inmunocitoquímico simple mediante el método del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC)*

Este método utiliza anticuerpos secundarios marcados con biotina y un complejo avidina-biotina-peroxidasa. Para la visualización de la actividad peroxidasa, se utiliza como sustrato de la peroxidasa H_2O_2 al 0.003% y como cromógeno 3,3'-diaminiobencidina-4HCl (DAB) al 0,05% en TF. La DAB es un compuesto soluble en soluciones acuosas, pero cuando se oxida por el oxígeno desprendido de la catálisis del H_2O_2 forma un precipitado de color marrón que es fácilmente visible a microscopía óptica y que, además, también es visible en el microscopio electrónico de transmisión si se intensifica con tetraóxido de osmio.



4.8.1.1.1. Cuando el estudio queda restringido a la microscopía óptica convencional

Todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Entre cada paso las secciones fueron lavadas abundantemente con TF.

El primer paso consistió en bloquear los posibles sitios de uniones inespecíficas de los anticuerpos al tejido incubando las secciones con la solución de bloqueo durante una hora. A continuación, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de incubación durante 24 horas. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 en TF durante dos horas; después, se incubaron con el complejo ABC diluido 1:200 en TF durante otras dos horas. La detección de la actividad peroxidasa se realizó utilizando DAB y H₂O₂ y la obtención del marcaje fue controlada bajo el microscopio. Una vez se obtuvo el marcaje óptimo, las secciones fueron osmificadas con una solución de tetraóxido de osmio al 1% y glucosa al 7% en TF durante una hora en oscuridad, deshidratadas con alcoholes de gradación creciente (etanol de 30°, 50°, 70°, 96° y 100°), aclaradas con óxido de propileno e incluidas en plano en resina Durcupan entre un portaobjetos y un cubreobjetos para su posterior análisis microscópico.

Para la inclusión en plano, las secciones se dejaron toda la noche en resina a temperatura ambiente para favorecer su infiltración en el tejido. Posteriormente, se colocaron entre un portaobjetos no gelatinizado y un cubreobjetos. De esta manera, se introdujeron en una estufa y la resina fue polimerizada durante 48 horas a 60°C, tras lo cual las secciones ya pudieron ser estudiadas bajo el microscopio.

La osmificación de las secciones para la microscopía óptica se realizó con el fin de intensificar la marca de DAB. En muchos casos este aumento de la marca permitió identificar elementos positivos como algunos axones, espinas dendríticas, etc. que antes de la osmificación no tenían la suficiente tinción como para ser apreciados al microscopio.

4.8.1.1.2. Cuando el estudio implica un posterior análisis con microscopía electrónica de transmisión

Cuando realizamos la detección inmunohistoquímica para su posterior análisis a microscopía electrónica de transmisión se ha de tener especial cuidado en que todas las soluciones preparadas sean frescas y estén a 4°C.

Después de una incubación de una hora en la solución de bloqueo a temperatura ambiente, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de incubación durante un período de tiempo que osciló entre 48 y 72 horas a 4°C. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 en TF durante dos horas y otras dos horas con el complejo ABC diluido 1:200 en TF; ambos pasos fueron realizados a temperatura ambiente. La detección de

la actividad peroxidasa se realizó utilizando DAB y H_2O_2 y el revelado fue controlado bajo el microscopio. Una vez se obtuvo el marcaje óptimo, las secciones fueron osmificadas en una solución de tetraóxido de osmio al 1% y 7% de glucosa en TF durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de cada paso, las secciones fueron abundantemente lavadas con TF.

Previamente a la deshidratación con alcoholes y a la inclusión en la resina epoxi, el tejido destinado a la microscopía electrónica fue contrastado con acetato de uranilo. Las soluciones utilizadas en el protocolo de contrastado con acetato de uranilo fueron:

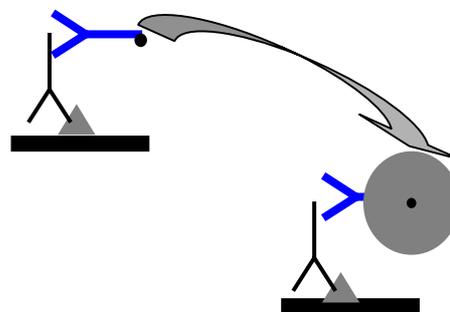
- Solución Stock. Se preparó disolviendo 2,32 gramos de ácido maléico y 0,8 gramos de NaOH en un volumen final de 100 ml de agua destilada.
- Solución de lavado. Se preparó mezclando 50 ml de agua destilada, 20 ml de Solución Stock y 1,8 ml de NaOH 0.2N.
- Solución de coloración. Se preparó disolviendo 0,5 gramos de acetato de uranilo en una mezcla de 13 ml de agua destilada, 6 ml de Solución Stock y 4 ml de NaOH 0,2 N. La solución resultante se sonicó hasta que el acetato de uranilo se hubo disuelto completamente y se mantuvo siempre en oscuridad y a 4°C.

El protocolo de contrastado con el acetato de uranilo se realizó de la siguiente manera: después de haber osmificado las secciones, y de haberlas lavado abundantemente en TF, se les dio dos lavados de 15 minutos en la solución de lavado. A continuación, se trataron durante 90 minutos con la solución de coloración y posteriormente volvieron a lavarse (3 lavados de 10 minutos) en la solución de lavado. Todos estos pasos se realizaron a 4°C. Por último, las secciones se deshidrataron en frío, a 4°C, con alcoholes de gradación creciente, se aclararon con óxido de propileno y se incluyeron en plano en resina Durcupan.

4.8.1.1.2. *Marcaje inmunocitoquímico simple utilizando oro coloidal*

Este método emplea una partícula de oro coloidal de 1 nm de diámetro unida al anticuerpo secundario para visualizar el antígeno. El marcaje obtenido con este método es fácilmente visible a microscopía óptica y electrónica de transmisión tras una amplificación de las partículas de oro con revelador físico a base de sales de plata. En los estudios de microscopía electrónica de transmisión, este método permite establecer de forma precisa la localización subcelular de los antígenos.

La detección inmunocitoquímica por este método se realizó principalmente para material destinado a microscopía electrónica de transmisión; por ello, se ha de tener



especial cuidado en que todas las soluciones preparadas sean frescas y en que estén a 4°C.

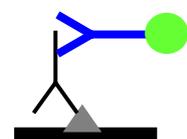
Después de una incubación de una hora en la solución de bloqueo a temperatura ambiente, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de incubación durante un período de tiempo comprendido entre 48 y 72 horas a 4°C. A continuación, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y 24 horas a 4°C con el anticuerpo secundario que lleva unidas las partículas de oro coloidal de 1 nm de diámetro diluido 1:100 en la solución de incubación. El paso siguiente consistió en la fijación de los anticuerpos al tejido; para ello sumergimos las secciones en una solución de 2% de glutaraldehído diluido en TFS, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones fueron lavadas abundantemente con TFS entre cada paso.

Inmediatamente después, las partículas de oro fueron amplificadas con una solución de sales de plata para permitir su detección en el microscopio óptico y en el microscopio electrónico de transmisión. Antes y después de la amplificación de las partículas de oro, el tejido tuvo que ser acondicionado lavándolo con una solución acondicionadora (Aurion ECS. AURION Immuno Gold Reagents & Accessories Custom Labelling, The Netherlands) diluida 1:10 en agua; se realizaron 4 lavados de 10 minutos con la solución acondicionadora a temperatura ambiente. Después de lavar, la amplificación de las partículas de oro se llevó a cabo incubando las secciones en oscuridad, a 20°C y durante 15-20 minutos con el kit comercial "AURION R-GENT SE-LM" (AURION). Este kit se empleó mezclando en proporción 1:1 el revelador y el amplificador. Para parar la reacción de amplificación, las secciones se lavaron con tiosulfato sódico 0.03 M diluido en la solución acondicionadora.

Una vez se obtuvo y se amplificó el marcaje inmunohistoquímico, las secciones fueron osmificadas incubándolas con una solución de tetraóxido de osmio al 1% en TF durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. La deshidratación posterior se llevó a cabo a 4°C y utilizando una batería de gradación creciente de alcoholes (30°-50°-70°). Al llegar al etanol de 70° se procedió al contraste del tejido con una solución de acetato de uranilo diluido al 2% en etanol de 70° durante 45 minutos, a 4°C y en oscuridad. Seguidamente se prosiguió con la deshidratación del tejido (etanol de 70°-96°-100°), su aclarado con óxido de propileno y su inclusión en plano en resina Durcupan (de igual forma que la descrita en el apartado 4.8.1.1.1.).

4.8.1.1.3. *Marcaje inmunocitoquímico simple mediante fluorescencia*

Este método de detección nos permite visualizar las células que contienen el antígeno utilizando para ello anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos. El análisis del marcaje se realiza con un



microscopio equipado con epifluorescencia o con un microscopio confocal.

Todos los pasos de este protocolo fueron realizados a temperatura ambiente. El primer paso consistió en la incubación de las secciones en la solución de bloqueo durante 45 minutos. A continuación, las secciones se incubaron durante 24 horas con el anticuerpo primario diluido en la solución de incubación. Tras este paso, las secciones se incubaron durante dos horas en oscuridad con el anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo. Por último, las secciones se montaron con una solución de N-propil-galeato sobre portaobjetos gelatinizados.

La solución de N-propil-galeato se utiliza como medio de montaje para evitar la pérdida de fluorescencia que se produce en las preparaciones con el tiempo. Para preparar el medio de montaje se disuelven, en un volumen final de 30 ml de agua destilada, 0,42 gramos de glicina, 0,021 gramos de NaOH, 0,51 gramos de NaCl, 0,03 gramos de azida sódica y 5 gramos de N-propil-galeato. La mezcla se agita durante 24 horas a temperatura ambiente y una vez que están todos los componentes disueltos se añaden 70 ml de glicerol y se deja agitando otras 24 horas a temperatura ambiente. El medio de montaje se guarda a 4°C en oscuridad hasta su uso.

4.8.1.2. **Marcaje inmunocitoquímico simple en postinclusión sobre secciones semifinas**

Este protocolo de detección inmunocitoquímica fue llevado a cabo mediante el método del ABC en secciones semifinas obtenidas a partir de material que previamente había sido incluido en resina Durcupan. Todos los pasos fueron realizados sobre portaobjetos con las secciones pegadas y no sobre secciones flotantes.

Primero se obtuvieron las secciones semifinas de 2µm de grosor con un ultramicrotomo y se recogieron sobre portaobjetos gelatinizados. Antes de comenzar las incubaciones con los anticuerpos, la resina de las secciones fue corroída incubando las mismas durante 12 minutos con una mezcla de 50% de etóxido sódico, 30% de acetona y 20% de tolueno (preparada al menos 48 horas antes de su uso). Posteriormente, las secciones fueron rehidratadas pasándolas por una batería de alcoholes de gradación decreciente (100°-96°-70°-50°) hasta agua destilada. Cuando el material había sido previamente tratado con tetraóxido de osmio antes de su inclusión en resina, el osmio que pudiera haber en la muestra se eliminó incubando las secciones durante 10 minutos con metaperyodato sódico al 1% en agua. Después, se realizó un bloqueo de los posibles sitios de unión inespecífica de los anticuerpos incubando las secciones durante 30 minutos con 10% de NGS y 0,1% de Triton X-100 en TFS. A continuación, las secciones se incubaron durante 24 horas con el anticuerpo primario diluido en TFS con 1% de NGS. Seguidamente, las secciones se incubaron durante 50 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 en TFS y después otros 45 minutos con el complejo ABC diluido 1:200 en TFS. La actividad peroxidasa fue revelada utilizando DAB y H₂O₂ tal y como ha sido descrito previamente. Una vez se hubo obtenido el

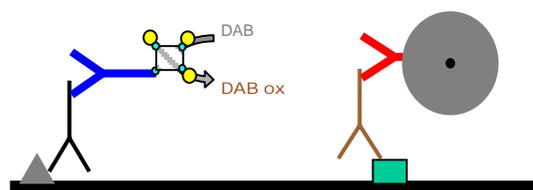
marcaje inmunohistoquímico, las secciones fueron osmificadas durante 2 minutos con una solución de tetraóxido de osmio al 1% diluido en TF. Finalmente, fueron deshidratadas con una batería de alcoholes de gradación creciente, aclaradas con xilol y montadas con Eukitt.

Las secciones fueron lavadas abundantemente con TFS entre cada paso. Todos los pasos, excepto el de la corrosión de la resina, fueron llevados a cabo a temperatura ambiente y en una cámara húmeda.

4.8.2. Marcajes inmunocitoquímicos dobles

4.8.2.1. **Marcaje inmunocitoquímico doble con ABC y oro coloidal en preinclusión**

Esta técnica de doble marcaje inmunocitoquímico combinando el método del ABC y el de oro coloidal de 1 nm sirve para poder detectar a la vez y distinguir dos antígenos diferentes en el microscopio óptico y en el microscopio electrónico de transmisión, siendo la detección de uno de ellos, además, una detección específica a nivel subcelular.



4.8.2.1.1. *Dobles marcajes cuando los anticuerpos son de distinto origen*

Cuando los dos anticuerpos primarios utilizados son de distinto origen, se puede hacer una única incubación con una mezcla de los dos anticuerpos primarios y una única incubación con una mezcla de los dos anticuerpos secundarios. Cuando el estudio del marcaje se destina a microscopía electrónica de transmisión, las soluciones han de ser frescas y han de estar a 4°C.

El primer paso fue el bloqueo de los posibles sitios de unión inespecífica de los anticuerpos incubando las secciones durante 60 minutos a temperatura ambiente en la solución de bloqueo. A continuación, los cortes se incubaron con una mezcla de los dos anticuerpos primarios diluidos en la solución de incubación durante un período de tiempo comprendido entre 48 y 72 horas a 4°C. Después de este tiempo, las secciones se incubaron con la mezcla de los dos anticuerpos secundarios (el biotinilado y el que lleva unidas las partículas de oro de coloidal de 1 nm de diámetro) diluidos en la solución de incubación (1:200 el anticuerpo biotinilado y 1:100 el anticuerpo conjugado con oro) durante 2 horas a temperatura ambiente y 24 horas a 4°C. Acto seguido, se fijaron los anticuerpos al tejido incubando las secciones con glutaraldehído al 2% en TFS a temperatura ambiente durante 10 minutos. Inmediatamente después, el oro fue amplificado (de igual forma que se explica en el apartado 4.8.1.1.2.). Los siguientes pasos fueron la incubación de las secciones durante dos horas a temperatura ambiente con el complejo ABC diluido 1:200 en TF y la detección de la actividad peroxidasa utilizando DAB y H₂O₂ (como se explica en el apartado 4.8.1.1.1.). Una vez se obtuvieron sendos marcajes

inmunohistoquímicos, las secciones fueron osmificadas incubándolas durante 60 minutos con tetraóxido de osmio al 1% en TF en oscuridad y a temperatura ambiente, contrastadas durante 45 minutos con 2% de acetato de uranilo en etanol de 70°, deshidratadas con una batería de alcoholes de gradación creciente, aclaradas con óxido de propileno e incluidas en plano en resina Durcupan para su posterior análisis.

4.8.2.1.2. *Dobles marcajes cuando los anticuerpos son del mismo origen*

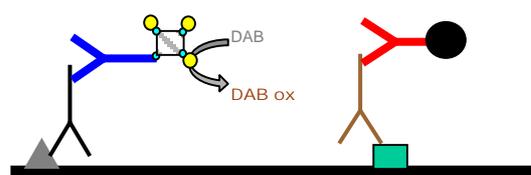
La detección inmunohistoquímica de dos antígenos diferentes en las mismas secciones utilizando anticuerpos primarios del mismo origen obliga a realizar dos detecciones inmunocitoquímicas simples de manera secuencial. En primer lugar se realiza la técnica inmunohistoquímica donde se utilizan las partículas de oro coloidal como sistema de detección y, en segundo lugar, la técnica inmunohistoquímica donde la DAB actúa como cromógeno. Como en el caso anterior, cuando estas técnicas están destinadas al análisis con el microscopio electrónico, las soluciones han de ser frescas y estar a 4°C.

Después de 60 minutos de incubación en la solución de bloqueo a temperatura ambiente, las secciones fueron incubadas con el primer anticuerpo primario diluido en la solución de incubación durante un período de tiempo comprendido entre 48 y 72 horas a 4°C. A continuación, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con el oro coloidal diluido 1:100 en la solución de incubación durante 2 horas a temperatura ambiente y 24 horas a 4°C. Después, se fijaron los anticuerpos al tejido incubando las secciones con glutaraldehído al 2% en TFS. Inmediatamente después, se amplificó el tamaño de las partículas del oro coloidal como se ha descrito anteriormente (apartado 4.8.1.1.2.). Una vez se obtuvo el primer marcaje inmunohistoquímico se procedió a la detección del segundo antígeno.

Para detectar el segundo antígeno, las secciones se incubaron con el segundo anticuerpo primario diluido en la solución de incubación durante un período de tiempo comprendido entre 48 y 72 horas a 4°C. Posteriormente, se incubaron dos horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 en TF y otras dos horas con el complejo ABC diluido 1:200 en TF. La detección de la actividad peroxidasa fue realizada utilizando DAB y H₂O₂ y el revelado fue controlado bajo el microscopio. Una vez se obtuvieron sendos marcajes inmunohistoquímicos, las secciones fueron osmificadas con tetraóxido de osmio al 1% diluido en TF durante 60 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, contrastadas en oscuridad y a 4°C con acetato de uranilo al 2% en etanol de 70° durante 45 minutos, deshidratadas en frío con una batería de alcoholes de gradación creciente, aclaradas con óxido de propileno e incluidas en resina Durcupan para su posterior análisis.

4.8.2.2. **Marcaje inmunohistoquímico doble con ABC en preinclusión y oro coloidal en postinclusión**

En ocasiones, después de analizar al microscopio óptico material teñido con la técnica inmunocitoquímica del ABC en preinclusión, se realizó una segunda detección inmunocitoquímica en postinclusión. Para ello, una vez se hubo observado el material a microscopía óptica, elegimos qué elementos queríamos estudiar a microscopía electrónica de transmisión para realizar sobre ellos la segunda detección inmunocitoquímica. Estos elementos fueron recortados de la sección previamente incluida en plano en Durcupan y reincluidos en la misma resina. Posteriormente, de ellos se obtuvieron secciones ultrafinas de 60 nm de grosor, que se recogieron sobre rejillas de ojal de níquel cubiertas de Formvar (ver apartado 4.9.). Sobre el tejido recogido en estas rejillas, se detectó la presencia del segundo antígeno (que siempre fue GABA) utilizando para ello anticuerpos secundarios conjugados con oro coloidal de 10 nm de diámetro.



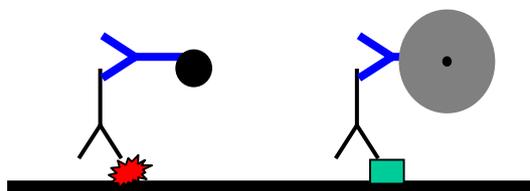
Para proceder a la detección de GABA en postinclusión, las secciones ultrafinas, ya dispuestas sobre las rejillas de ojal, fueron tratadas con ácido periódico al 1% en agua durante 10 minutos. Después, fueron tratadas con metaperyodato sódico al 2% en agua durante 15 minutos. Estos tratamientos se utilizaron para eliminar el osmio de la superficie expuesta del tejido y algún grupo hidrófobo de la resina más superficial, para permitir una mejor inmunorreactividad en postinclusión. Tras estos dos pasos, que hacen que los antígenos queden mejor expuestos a los anticuerpos, bloqueamos los posibles sitios de unión inespecífica de los anticuerpos en las secciones incubando con ovoalbúmina al 1% en TTS durante 30 minutos. A continuación, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario diluido en TTS con NGS al 1%, durante 2 horas. Después, se incubaron durante otras dos horas en oscuridad con el anticuerpo secundario que llevaba unidas partículas de oro coloidal de 10 nm diluido 1:15 en TT con Tween 20 al 0,5%. Los pasos siguientes son similares a los descritos en los apartados anteriores donde se describía la detección inmunocitoquímica mediante partículas de oro: fijación de los anticuerpos al tejido incubando durante dos minutos los cortes con glutaraldehído al 2% en TFS y después amplificación de las partículas de oro coloidal. En este caso, la amplificación de las partículas de oro coloidal se lleva a cabo en oscuridad incubando las secciones durante dos minutos en un revelador físico consistente en una mezcla en proporción 2:1 de las soluciones A y B. La solución A se obtiene de la siguiente manera: a 9 ml de una solución de goma arábiga al 50% se le añade 1) 0,756 gramos de ácido cítrico y 0,705 gramos de citrato trisódico previamente diluidos en 3 ml de agua destilada y 2) 0,51 gramos de hidroquinona previamente diluidos en 9 ml de agua. La solución B se obtiene diluyendo 0,026 gramos de nitrato de plata en 10 ml de agua destilada.

Tras la amplificación, contrastamos los cortes con acetato de uranilo a saturación en agua durante 45 minutos. Por último, teñimos los cortes durante 12 minutos con una solución de citrato de plomo (solución de Reynolds). Las tinciones con acetato de uranilo y con citrato de plomo se realizaron en oscuridad.

Este protocolo de detección inmunohistoquímica se llevó a cabo colocando las rejillas sobre las gotas de las soluciones empleadas. Todas las soluciones utilizadas fueron filtradas con filtros millipore antes de entrar en contacto con las rejillas. Las secciones fueron lavadas abundantemente con agua destilada o con tampones entre cada paso (ver protocolo detallado en Anexo I). Todos los pasos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

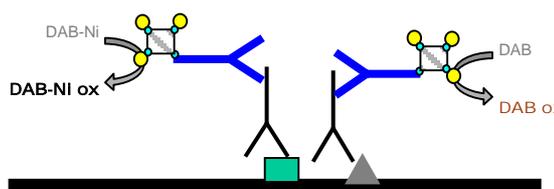
4.8.2.3. *Marcaje inmunohistoquímico doble con partículas de oro coloidal amplificado en preinclusión y con partículas de oro coloidal de un tamaño determinado en postinclusión*

Esta técnica nos sirvió para determinar la presencia de dos antígenos diferentes al microscopio electrónico de transmisión utilizando para ello dos anticuerpos secundarios marcados con oro coloidal de dos tamaños diferentes. Para realizar esta técnica se detectó el primer antígeno mediante un marcaje en preinclusión utilizando anticuerpos secundarios conjugados con partículas de oro coloidal de 1 nm de diámetro que luego son amplificadas con nitrato de plata (protocolo descrito en apartado 4.8.1.1.2.). El segundo antígeno, que siempre fue GABA, se detectó en postinclusión utilizando para ello anticuerpos secundarios marcados con partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro que luego no son amplificadas. Para la detección de GABA en postinclusión, el protocolo utilizado es el mismo que el descrito en apartado 4.8.2.2. y las secciones ultrafinas empleadas fueron de 80 nm de grosor.



4.8.2.4. *Marcaje inmunohistoquímico doble con DAB y DAB-Ni en preinclusión*

La DAB se puede conjugar con níquel (DAB-Ni) para dar un cromógeno de color diferente a la DAB. Cuando la DAB-Ni se oxida da un precipitado de color negro que es visible a microscopía óptica y fácilmente diferenciable del precipitado de color marrón que da la DAB. Combinando ambos cromógenos, se pueden diseñar dobles marcajes inmunocitoquímicos para detectar dos antígenos diferentes a microscopía óptica, realizando, para ello, dos técnicas inmunocitoquímicas secuenciales siguiendo en



ambas el método del ABC: la primera se revela con DAB-Ni y la segunda con DAB. Nosotros hemos utilizado este método cuando el marcaje inmunohistoquímico doble con fluorescencia no fue posible.

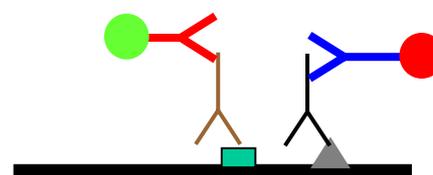
En este protocolo, todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente. Después de una incubación de 45 minutos en la solución de bloqueo, las secciones se incubaron con el primer anticuerpo primario diluido en la solución de incubación durante 24 horas. Después, se incubaron con el primer anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 en TF durante dos horas y a continuación durante otras dos horas con el complejo ABC diluido 1:200 en TF. La actividad peroxidasa fue revelada utilizando DAB-Ni como primer cromógeno. Una vez se obtuvo el marcaje óptimo, se procedió a la segunda detección inmunohistoquímica. Entre una detección inmunocitoquímica y la siguiente, el tejido fue incubado con azida sódica al 0,05% en TF.

Realizada la primera detección inmunocitoquímica, las secciones se incubaron con el segundo anticuerpo primario diluido en la solución de incubación durante 24 horas. Después, se incubaron con el segundo anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 en TF durante dos horas y a continuación con el complejo ABC diluido 1:200 en TF durante otras dos horas. En esta ocasión, la detección de la actividad peroxidasa se hizo utilizando DAB como cromógeno. Una vez tuvimos los dos marcajes inmunohistoquímicos, se procedió a la deshidratación de las secciones con alcoholes de gradación creciente, a su aclarado con óxido de propileno y a su inclusión en plano en resina para su posterior análisis.

En este protocolo de doble detección inmunocitoquímica no se realizó la intensificación de la DAB con tetraóxido de osmio, ya que esto hubiera podido provocar un viraje a color marrón en el precipitado negro de la DAB-Ni y de esta forma no se hubieran podido diferenciar las células marcadas con DAB de las células marcadas con la DAB-Ni.

4.8.2.5. **Marcaje inmunohistoquímico doble con fluorescencia**

Este método de doble detección inmunocitoquímica nos permite estudiar la distribución de dos antígenos y ver si existe colocalización de ambos en las mismas células utilizando, para ello, anticuerpos secundarios conjugados con dos fluorocromos distintos. Para analizar los resultados de este material, se utilizó un microscopio equipado con epifluorescencia o un microscopio confocal.

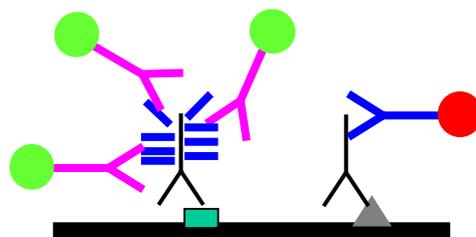


Para la detección inmunocitoquímica se sigue el mismo protocolo que el descrito en el apartado 4.8.1.1.3. Todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Después de cada paso las secciones fueron lavadas abundantemente con TFS. Después del paso de bloqueo, las secciones se incubaron durante 24 horas con la mezcla de los anticuerpos primarios correspondientes, diluidos en la solución de incubación. Tras este paso, las

secciones se incubaron durante dos horas y en oscuridad con la mezcla de los anticuerpos secundarios fluorescentes. Por último, las secciones se montaron con una solución de N-propil-galeato sobre portaobjetos gelatinizados.

4.8.2.6. *Marcaje inmunohistoquímico doble con fluorescencia con anticuerpos primarios del mismo origen mediante el empleo de fragmentos F(ab)*

Cuando se tuvo que realizar una doble detección inmunocitoquímica con fluorescencia y los anticuerpos primarios tenían el mismo origen, se realizaron las detecciones inmunohistoquímicas simples para cada uno de los dos antígenos de forma secuencial. Además, para evitar el posible cruce de ambos marcajes, se procedió a realizar un cambio de origen en el primero de los anticuerpos primarios mediante el uso de fragmentos F(ab) (según el método descrito en Gutiérrez-Mecinas et al., 2005). Todos los pasos de este protocolo se realizaron a temperatura ambiente. Después de cada paso las secciones fueron lavadas abundantemente con TFS.



Después de 45 minutos de incubación con la solución de bloqueo, las secciones se incubaron durante 24 horas con el primer anticuerpo primario (que siempre fue una IgG de conejo) diluido en la solución de incubación. Después, se incubaron durante una hora con fragmentos F(ab) de cabra anti-IgG de conejo diluidos 1:100 en TFS y posteriormente durante dos horas en oscuridad con un anticuerpo secundario fluorescente (IgG de burro anti-IgG de cabra) diluido 1:400 en TFS. A partir de este momento todos los pasos se realizaron en oscuridad. Después de esta primera inmunocitoquímica, se realizó un segundo bloqueo de una hora con solución de bloqueo y después se incubaron las secciones durante 24 horas con el segundo anticuerpo primario (también una IgG de conejo) diluido en la solución de incubación. A continuación, se incubaron durante dos horas con anticuerpo secundario fluorescente (IgG de burro anti-IgG de conejo) diluido en TFS. Por último, las secciones se montaron con la solución de N-propil-galeato sobre portaobjetos gelatinizados.

4.9. ULTRAMICROTOMÍA

Posteriormente al análisis de las secciones al microscopio óptico, parte de las secciones incluidas en plano en Durcupan fueron reincluidas en bloque en la misma resina y de ellas se obtuvieron secciones ultrafinas que fueron analizadas con el microscopio electrónico de transmisión. Para proceder a la reinclusión del tejido lo primero que se hizo fue despegar el cubreobjetos de la muestra; después de esto, bajo una lupa se recortó una pequeña área de tejido que fue colocada sobre un portaobjetos y alrededor suyo se colocó un cilindro de plástico que se rellenó con resina líquida; inmediatamente se procedió a la polimerización de la resina

introduciendo el portaobjetos en una estufa a 60°C durante 24 horas. Una vez pasado este tiempo, se extrajeron de la estufa los cilindros de resina polimerizada donde se encontraba el tejido reincluido. Se eliminó el cilindro de plástico quedando únicamente el bloque de resina listo para ser retallado y cortado en el ultramicrotomo.

El bloque de resina fue retallado en forma de pirámide truncada alrededor del área de tejido elegida. A continuación, se fueron sacando secciones semifinas de 1 μm de la resina hasta llegar a la superficie del tejido; esto se controló periódicamente tiñendo las secciones semifinas con azul de toluidina-borax (según el protocolo que aparece en el apartado 4.6.2.). Una vez se hubo llegado a la superficie del corte, empezaron a cortarse las secciones ultrafinas; las secciones ultrafinas que se obtuvieron para la mayoría de los experimentos tenían unos 60 nm de grosor. De forma puntual, para algunos experimentos, se seleccionó un grosor de corte de entre 70 y 80 nm. Se obtuvieron series de entre 6 y 8 cortes que se recogieron sobre rejillas de ojal de níquel cubiertas de Formvar.

La película de Formvar que recubre a las rejillas se prepara en un ambiente seco, diluyendo al 1% Formvar en polvo en cloroformo y utilizando para ello un recipiente completamente seco. Para facilitar la disolución, la solución se deja agitando toda la noche. Una vez tenemos el Formvar disuelto se prepara una fina película introduciendo un portaobjetos limpio y desengrasado en la solución de Formvar durante 5 segundos para dejarlo después secar al aire. Una vez se ha secado, el portaobjetos se introduce en un recipiente con agua destilada muy lentamente para que la película de Formvar se vaya despegando de la superficie del portaobjetos y vaya quedando a flote sobre la superficie del agua. Una vez tenemos la película de Formvar flotando sobre el agua se colocan las rejillas de ojal sobre ella para que se adhieran. Finalmente, las rejillas recubiertas con la película de Formvar, se recogen con un trozo de parafilm y se dejan secar durante al menos 24 horas a temperatura ambiente antes de su uso.

4.10. CRIULTRAMICROTOMÍA

La crioultramicrotomía es un método de obtención de cortes ultrafinos por congelación (que sirven para su análisis a microscopía electrónica de transmisión) que se plantea como alternativa a la inclusión del tejido en resinas. Con esta metodología, aparte de secciones ultrafinas de entre 50 y 80 nm, también pueden obtenerse secciones semifinas de entre 0,3 y 0,5 μm que pueden ser analizadas a microscopía óptica.

En este estudio, se han utilizado secciones semifinas adyacentes obtenidas por crioultramicrotomía para estudiar la colocalización de diferentes marcadores en una misma célula.

4.10.1. Obtención de secciones semifinas mediante la técnica de crioultramicrotomía

Los bloques de tejido que se utilizan para obtener las secciones son de aproximadamente 1 mm³. Para obtener estos bloques utilizamos uno de los bulbos olfatorios de los animales perfundidos y lo troceamos en pequeños cubos que fueron encastrados en gelatina al 10% en TF y posteriormente embebidos en sacarosa 2,3 M en TF durante al menos 24 horas. La sacarosa se utilizó como agente crioprotector. El paso siguiente consistió en el montaje de los bloques sobre “pins” (los soportes utilizados para obtener los cortes en el crioultramicrotomo) utilizando la misma sacarosa como agente adhesivo. Acto seguido, los bloques se introdujeron en nitrógeno líquido, donde se guardaron hasta el momento de su uso.

Para obtener las secciones se utilizó un crioultramicrotomo REICHERT & JUNG y una cuchilla de diamante de 35° DIATOME. En este aparato existe una cámara que alcanza una temperatura de -120°C, temperatura necesaria para la perfecta obtención de los cortes. Esta temperatura, además, no solamente es necesaria en la cámara, sino también en el bloque a cortar y en la cuchilla utilizada para ello. El grosor de las secciones semifinas que se obtuvieron fue de 0,5 µm. Una vez obtenidas, se recogieron y se dispusieron sobre portaobjetos poli-L-lisinados ordenados en series alternas que nos permitieran hacer distintas detecciones inmunohistoquímicas sobre cortes adyacentes.

4.10.2. Doble detección inmunohistoquímica en secciones semifinas adyacentes de tejido obtenidas por crioultramicrotomía

El protocolo de detección es prácticamente igual al de "detección inmunohistoquímica simple para microscopía óptica mediante el complejo ABC" (descrito en el apartado 4.8.1.1.1.), variando ligeramente los tiempos de incubación y teniendo en cuenta que todos los pasos se realizan sobre portaobjetos con las secciones pegadas y no sobre secciones flotantes.

En primer lugar se bloquearon los posibles lugares de uniones inespecíficas de los anticuerpos incubando las secciones durante 30 minutos en una solución formada por glicina 0,2 M en TFS. El siguiente paso fue su incubación durante 1 hora con el anticuerpo primario diluido en una solución formada por BSA al 2% en TFS. Posteriormente las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 en TFS durante 45 minutos. Después, se incubaron con el complejo ABC diluido 1:200 en TF durante otros 45 minutos. La detección de la actividad peroxidasa se hizo con DAB y H₂O₂. Una vez se obtuvo el marcaje inmunohistoquímico, éste se intensificó durante 2 minutos con 1% de tetraóxido de osmio en TF. Por último, las secciones fueron deshidratadas con alcoholes de gradación creciente, aclaradas con xilol y montadas con Eukitt. Todos los pasos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente. Después de cada paso las secciones fueron lavadas abundantemente con TF.

RESULTADOS

5.1. PRODUCCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO

El bulbo olfatorio principal, junto con el cerebelo, son las regiones del cerebro donde hay mayor número de células productoras de óxido nítrico. Son muchos los trabajos realizados donde se describe la presencia de poblaciones concretas de neuronas productoras de óxido nítrico en el bulbo olfatorio. Estas neuronas incluyen células periglomerulares, células granulares y algunas poblaciones de células superficiales y profundas de axón corto (Scott y col., 1987; Croul-Ottman y Brunjes, 1988; Villalba y col., 1989; Davis, 1991; Vincent y Kimura, 1992; Alonso y col., 1993, 1995; Hopkins y col., 1996; Briñón y col., 1997).

En los glomérulos olfatorios se ha descrito que las células periglomerulares que contienen nNOS son GABAérgicas y, por lo tanto, se ha admitido que son una subpoblación de PG1 (PG1-nNOS) (Crespo y col., 2003). Sin embargo, hasta el momento no se han estudiado sus relaciones sinápticas en el interior del neuropilo glomerular a nivel de microscopía electrónica de transmisión. Como un primer paso en nuestro estudio, nos propusimos estudiar estas células, analizando si sus dendritas se encuentran distribuidas en los dos compartimentos que forman el neuropilo glomerular (el compartimento sensorial y el compartimento sináptico) y si reciben contactos sinápticos asimétricos desde los terminales axónicos del nervio olfatorio, ya que estas son las dos características indispensables para ser catalogadas como PG1. Además, como se ha propuesto que la nNOS se encuentra próxima a los contactos sinápticos asimétricos donde el neurotransmisor utilizado es glutamato (Aoki y col., 1997; Zhang y col., 1996; Brenman y col., 1996 y 1997), también hemos analizado si existe una localización subcelular específica de la enzima en el elemento postsináptico en relación con estos contactos.

5.1.1. Relaciones sinápticas de las PG1-nNOS en el interior del neuropilo glomerular

Después de realizar una detección inmunocitoquímica de nNOS en el bulbo olfatorio, observamos que aparecían elementos positivos tanto en la capa de los glomérulos olfatorios, donde apareció marcada una población de células periglomerulares y algunas células superficiales de axón corto, como en la capa de las células granulares, donde se vieron marcadas algunas células granulares y algunas células profundas de axón corto (fig 20). Identificamos las células periglomerulares por la morfología redondeada y por el tamaño de sus somas (de entre 5 y 8 μm). Estas células se encuentran distribuidas alrededor de todo el glomérulo olfatorio, situándose indistintamente en las zonas más profundas o más superficiales de la capa. De estas células periglomerulares emerge una dendrita que penetra en el interior del glomérulo olfatorio, donde se ramifica. Las células superficiales de axón corto, a su vez, se identifican por el tamaño (mayores de 10 μm) y morfología de su soma (más ovalado o fusiforme). Las dendritas de estas

células, aunque se ramifican por la capa de los glomérulos olfatorios, no penetran en el interior glomerular.

Una vez estudiadas las secciones con el microscopio óptico convencional, reincluimos parte del neuropilo glomerular, del que obtuvimos secciones ultrafinas de 60 nm que fueron analizadas con el microscopio electrónico de transmisión. El primer punto que comprobamos fue que todos los perfiles inmunorreactivos para nNOS pertenecían a células periglomerulares. Para ello nos basamos en la sinaptología: los perfiles dendríticos correspondientes a células periglomerulares reciben contactos sinápticos asimétricos desde las células principales; a su vez, realizan contactos sinápticos simétricos sobre células principales o sobre otras células periglomerulares. Una vez vimos que todos los perfiles marcados se correspondían con células periglomerulares, analizamos su distribución: vimos que había perfiles positivos tanto en el compartimento sináptico como en el compartimento sensorial. Por último, comprobamos que estos perfiles recibían contactos sinápticos asimétricos desde los terminales axónicos del nervio olfatorio. También vimos algunas de estas células periglomerulares recibiendo contactos sinápticos desde axones de origen centrifugo (fig 21).

Una vez confirmada la pertenencia de las células periglomerulares productoras del óxido nítrico a la población de PG1, estudiamos si existía una distribución subcelular específica de la nNOS en las células positivas. Aunque la nNOS es una enzima citosólica que no se encuentra específicamente asociada a membrana, se ha propuesto su proximidad a contactos sinápticos asimétricos del elemento postsináptico. Para comprobar este punto, la nNOS fue detectada, en preinclusión, utilizando como marcador oro coloidal de 1 nm de diámetro amplificado con nitrato de plata. El análisis de este material a microscopía electrónica, mostró la existencia de partículas de oro coloidal en regiones perisinápticas o sobre la propia especialización (fig 21E,F). Sin embargo, también se observaron partículas de oro coloidal libres en el interior del citoplasma dendrítico (fig 21D).

5.2. VÍA DE ACTUACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE LA ENZIMA GUANILATO CICLASA SOLUBLE Y LA PRODUCCIÓN DE GMPc

5.2.1. Descripción de la distribución de la enzima guanilato ciclasa soluble

Queremos saber cuáles son las dianas de actuación del óxido nítrico en su vía de actuación mediada por el segundo mensajero GMPc. Sabemos que el óxido nítrico, en condiciones fisiológicas, actúa principalmente activando la enzima GCs. De esta forma, para saber sobre qué elementos actúa, podemos analizar en qué elementos se expresa la GCs. En nuestro estudio, se ha analizado el patrón de distribución de GCs en el bulbo olfatorio principal utilizando la detección inmunocitoquímica de su subunidad $\beta 1$. Paralelamente, se hicieron estudios de

detección de la subunidad $\alpha 1$ y se observó una distribución celular idéntica a la observada para $\beta 1$, llegando a la conclusión de que ambas subunidades se encuentran en los mismos elementos. Este dato se vio confirmado mediante estudios de colocación de ambas subunidades con inmunofluorescencia.

5.2.1.1. Distribución de la guanilato ciclasa soluble y caracterización de las células que contienen esta enzima en el bulbo olfatorio principal

En el análisis a microscopía óptica de la distribución de la GCs, se vio que existen células inmunorreactivas en todas las capas del bulbo olfatorio principal de la rata, siendo la capa de los glomérulos olfatorios la capa con mayor presencia de elementos positivos (fig 22A). En la capa plexiforme externa prácticamente no aparecen células marcadas; por el contrario, sí aparecen algunas células inmunoreactivas en la capa de las células mitrales, en la capa plexiforme interna y en la parte más superficial de la capa de los granos. Estas células, por su morfología, corresponden a diferentes tipos de interneuronas. Por el contrario, las células principales no expresan GCs. Tampoco hay expresión en los axones de los receptores olfatorios.

5.2.1.1.1. Caracterización de las células que expresan guanilato ciclasa soluble en la capa de los glomérulos olfatorios

En la capa de los glomérulos olfatorios, las células que presentan inmunoreactividad para GCs se distribuyen, preferentemente, en la zona periglomerular más próxima a la capa plexiforme externa (fig 22B). Estas células tienen la morfología típica de las células periglomerulares: soma redondeado y de pequeño tamaño (aproximadamente 8 μm de diámetro), con una dendrita que penetra en el interior de un glomérulo olfatorio donde se ramifica (fig 22C). En estas células, el marcaje queda restringido al citoplasma, de manera que cuando las observamos al microscopio óptico lo que vemos teñido en el soma es un pequeño anillo citoplasmático alrededor del núcleo negativo que ocupa casi todo el cuerpo celular. Todo el árbol dendrítico de estas células también está marcado, de forma que el interior del neuropilo glomerular aparece intensamente teñido.

Después de caracterizar a microscopía óptica que las células marcadas eran células periglomerulares, se realizó un estudio de microscopía electrónica de transmisión para determinar la distribución intraglomerular de sus dendritas y su conectividad sináptica. Para ello, se reincluyeron glomérulos olfatorios donde había células inmunorreactivas y de ellos se obtuvieron secciones ultrafinas de 60 nm que posteriormente se analizaron detalladamente en el microscopio electrónico de transmisión. A pocos aumentos, a microscopía electrónica se pueden distinguir los dos compartimentos de que consta el neuropilo glomerular (compartimento sensorial, que aparece más electrondenso y compartimento sináptico, que aparece más electronlúcido). En este material se observó que la GCs estaba localizada en perfiles dendríticos que se encontraban, únicamente, en el compartimento sináptico; no se

apreciaron dendritas marcadas en el compartimento sensorial (fig 23). Al estudiar detalladamente la naturaleza de estos perfiles, se observó que correspondían a dendritas que, bien estaban recibiendo contactos sinápticos asimétricos por parte de dendritas de células principales, o bien estaban realizando contactos sinápticos simétricos sobre las mismas (fig 24). Estos datos nos confirman que las células que están expresando GCs en la capa de los glomérulos olfatorios son células periglomerulares. Además, el hecho de que las dendritas marcadas sólo se encuentren en el compartimento sináptico nos hace pensar que la GCs no está presente en todas las poblaciones de células periglomerulares, sino que estaría únicamente en la población de PG2, cuyas dendritas quedan restringidas al compartimento sináptico.

Para confirmar este hecho, se realizó una caracterización neuroquímica de las células positivas a GCs; para ello recurrimos a la doble detección inmunofluorescente de GCs con distintos marcadores neuroquímicos de las subpoblaciones de PG1 y PG2. En el estudio de colocalización de GCs con los marcadores de las subpoblaciones de PG1 (GABA, TH, nNOS y CCK) se vio que ninguna de estas subpoblaciones expresan GCs (fig 25A-D). Por tanto, era de suponer que la GCs estaría expresándose de forma específica en células pertenecientes a la población de PG2. En el estudio realizado para ver si la subpoblación de PG2-CR estaba expresando GCs no se vio colocalización de la proteína ligante de calcio y la GCs. Por el contrario, en el estudio realizado para ver si la subpoblación de PG2-CB estaba expresando GCs, se vio un alto porcentaje de colocalización de ambos marcadores (el 82% de las células que expresaban GCs eran PG2-CB, para $n=420$; a su vez, el 87% de las células PG2-CB estaban expresando GCs, para $n=396$) (fig 25E,F). Según estos datos, podemos concluir que las células que están expresando GCs en la capa de los glomérulos olfatorios y que, por tanto, son dianas para la acción del óxido nítrico a través de la ruta que implica la síntesis de GMPc, son las PG2-CB.

5.2.1.1.2. *Caracterización de las células que expresan guanilato ciclasa soluble en la capa plexiforme externa*

En la capa plexiforme externa prácticamente no aparecen células inmunorreactivas para GCs; las pocas células que aparecen marcadas presentan un soma ovoide de pequeño tamaño (de aproximadamente unas 8 μm de diámetro) con muy poca cantidad de citoplasma (fig 22D). El marcaje del soma queda localizado, como en el caso de las células periglomerulares, a la pequeña banda de citoplasma que aparece alrededor del núcleo, que ocupa casi todo el cuerpo celular. Del soma de estas células brota una dendrita que se dirige hacia los glomérulos olfatorios donde se ramifica (fig 22E,F). La morfología de estas células, no se corresponde con la de las células empenachadas ni con la de las interneuronas GABAérgicas descritas en la capa plexiforme externa, sino que coincide con la morfología típica de células periglomerulares. En algunos estudios previos al nuestro (Pombal y col.,

2002; Kosaka y col., 2005) se ha descrito la existencia de células periglomerulares desplazadas, es decir, de células periglomerulares que no se localizan en la zona periglomerular de los glomérulos olfatorios, sino en la capa plexiforme externa. En estos estudios, se vio que las células periglomerulares desplazadas contenían CB. Basándonos en estos datos, se estudió si las células inmunorreactivas para GCs que se encontraban en la capa plexiforme externa eran células periglomerulares como las observadas en la capa de los glomérulos olfatorios y, por lo tanto, estaban expresando CB. El análisis de colocación de GCs y CB con inmunofluorescencia mostró que las células que contenían GCs en la capa plexiforme externa expresaban CB y eran, en realidad, células periglomerulares desplazadas (fig 27A).

5.2.1.1.3. *Caracterización de las células que expresan guanilato ciclasa soluble en la capa de las células mitrales y en la capa plexiforme interna*

El análisis de la capa de las células mitrales permite identificar los somas de estas células en negativo, debido a la inexistencia de inmunoreactividad para GCs en las mismas y en contraste con el marcaje existente a su alrededor (fig 26A,B). En torno a la capa de las células mitrales, situándose en la zona más profunda de la capa plexiforme externa y en la capa plexiforme interna, aparece una población de células que presentan inmunoreactividad para GCs. Las células que aparecen marcadas en esta zona presentan un soma de menor tamaño que el de las células mitrales (entre 8 y 12 μm de diámetro). El soma tiene una morfología redondeada, ovoide o piriforme, de donde sale una dendrita que se dirige, generalmente, hacia la capa plexiforme externa donde se ramifica (fig 26E,F).

Estudios previos (Celio, 1990; Séquier y col., 1990; Briñón y col., 1992) han descrito una población poco abundante de interneuronas que tienen una distribución perimitral y cuya descripción morfológica es similar a la de estas células: somas de morfología ovalada o fusiforme con dendritas ascendiendo perpendicularmente a la laminación del bulbo olfatorio principal y ramificándose en la capa plexiforme externa. Estas interneuronas se caracterizan por expresar CB (Briñón et al, 1992) y se corresponden con las células verticales de Cajal, uno de los tipos morfológicos de las células profundas de axón corto del bulbo olfatorio principal de mamíferos. Para determinar si la población de células positivas para GCs en esta zona era la misma población celular que describían Briñón y col., (1992), se realizaron dobles detecciones inmunofluorescentes de GCs con CB. El análisis de este material a microscopía confocal mostró que todas las células que contienen GCs expresan CB (fig 27B); sin embargo, no todas las células identificadas como verticales de Cajal y que expresaban CB contenían GCs (aproximadamente, el 63% de las células verticales de Cajal CB-positivas contenían GCs). Estos datos nos permiten concluir que las células GCs-inmunopositivas que observamos en la región perimitral con una dendrita dirigida hacia la capa plexiforme externa, corresponde a una subpoblación de células verticales de Cajal.

5.2.1.1.4. *Caracterización de las células que expresan guanilato ciclasa soluble en la capa de las células granulares*

En la capa de las células granulares, distintos tipos de interneuronas presentan inmunorreactividad para GCs. Una de las poblaciones se corresponde morfológicamente con las células verticales de Cajal, descritas en el apartado anterior. Otra, está compuesta por células que tienen el soma dispuesto justo por debajo de la capa plexiforme interna y presentan una morfología variable, entre redondeada, ovalada o fusiforme y un diámetro que oscila entre las 13 y las 15 μm . Las dendritas de estas células se extienden de forma paralela a la laminación del bulbo olfatorio por la capa de las células granulares, donde se ramifican (fig 26C,D). Según esta distribución, morfología y distribución de sus dendritas, estas células podrían corresponderse con las células horizontales, otro tipo morfológico de células profundas de axón corto del bulbo olfatorio de los mamíferos. En estudios previos (Celio, 1990; Séquier y col., 1990; Briñón y col., 1992) se describió que las células horizontales, así como las verticales de Cajal, expresan CB. Para confirmar que las células con GCs que habíamos identificado como células horizontales realmente lo son, se hizo un estudio de colocalización con CB. El análisis a microscopía confocal de este material confirmó este hecho (fig 27C).

Por último, en la capa de las células granulares, aparece marcada una población de células positivas a GCs de mayor tamaño que las anteriores (con un soma de entre 15 y 18 μm) y de morfología muy variable (desde cuerpos celulares redondeados hasta algunos más poligonales) (fig 26F). Al realizar la doble detección inmunofluorescente de GCs con CB, se observó que estas células no presentaban CB (fig 27G), de manera que se realizó una doble detección inmunofluorescente de GCs con otras sustancias neuroactivas que marcan poblaciones de células profundas de axón corto, con el fin de poder caracterizarlas neuroquímicamente. Se realizaron estudios de colocalización de GCs con CR, PV, CCK y nNOS. Estos estudios demostraron que las interneuronas de gran tamaño que contenían GCs en la capa de las células granulares no integraban una única población neuroquímica. Aunque ninguna de ellas contenía CR o CCK (fig 27E,F), se vio colocalización parcial de GCs con nNOS y PV en algunas de estas interneuronas (fig 27D,E).

Aparte de estas células, en la capa de las células granulares puede observarse inmunorreactividad en algunas células fusiformes con procesos radiales que van desde la capa de la sustancia blanca hacia la capa de las células mitrales. Estas células, como se comentará con más detalle en el apartado siguiente, resultaron presentar doblecortina y fueron identificadas como neuroblastos procedentes de la corriente migratoria rostral que han iniciado un proceso de migración radial por las capas del bulbo olfatorio principal.

5.2.1.2. Distribución de la guanilato ciclasa soluble y caracterización de las células que contienen esta enzima en la corriente migratoria rostral

En la capa de la sustancia blanca, aparte de los elementos neuronales intrínsecos del bulbo olfatorio principal, aparece la parte más rostral de la corriente migratoria rostral. Algunos de los elementos que la componen contienen GCs. Estas células tienen una morfología redondeada o esférica y se encuentran siempre formando grupos o pequeñas cadenas que suelen localizarse próximos a los vasos sanguíneos (fig 28). Por su morfología y localización, se podría pensar que las células que contienen GCs son los neuroblastos migrantes de la corriente migratoria rostral o células de tipo A. Para confirmarlo, se procedió a su estudio mediante la microscopía electrónica de transmisión, ya que la descripción y clasificación original de estas células está basada casi exclusivamente en datos de características ultraestructurales (Lois y col., 1996; Doetsch y col., 1997).

El análisis a microscopía electrónica confirmó que las células que contienen GCs en la corriente migratoria rostral son las células de tipo A. Estas células muestran contornos irregulares y aparecen separadas unas de otras por unos espacios intercelulares característicos. El denso precipitado de DAB en el interior del citoplasma dificulta la visualización de algunos detalles ultraestructurales característicos de las células de tipo A, como son los abundantes microtúbulos y ribosomas libres. Sin embargo, el núcleo no presenta marcaje, de manera que en él se puede observar la abundancia de cromatina laxa, la presencia de heterocromatina dispersa y las ocasionales invaginaciones características de las células de tipo A (fig 29). También se analizó con el microscopio electrónico la expresión de GCs en el resto de tipos celulares que conforman la corriente migratoria rostral. En las células de morfología astrocitaria, también llamadas células de tipo B, así como en las endimocitarias, también llamadas células de tipo E y en los progenitores inmaduros, también llamadas células de tipo C, no se observó marcaje para GCs (fig 29C-E).

Para completar el estudio y confirmar los datos anteriores, se realizaron experimentos de colocalización de GCs con marcadores neuroquímicos de las diferentes poblaciones de células de la corriente migratoria rostral. Se utilizó doblecortina para marcar las células de tipo A, GFAP para marcar las células de tipo B y E y BrdU inyectada 2 horas antes del sacrificio del animal para marcar las células de tipo C. Los análisis realizados confirmaron que sólo la población de neuroblastos migrantes, las células de tipo A, contenían GCs (fig 30). Además de en la corriente migratoria rostral, las células que abandonan la corriente migratoria rostral e inician su migración radial a través de la capa de las células granulares hacia su lugar definitivo continuaban coexpresando GCs y doblecortina.

5.2.2. Análisis de las posibles vías de transducción del GMPc

El GMPc producido por la GCs tras su activación por parte del óxido nítrico, puede activar tres vías de señalización distintas dentro de las células: 1) vía de los canales iónicos activados por

la unión de nucleótidos cíclicos; 2) vía de las proteínas kinasas dependientes de GMPc y 3) vía de las fosfodiesterasas. En función de la vía que se activa, la respuesta celular será de un tipo o de otro. Lo que hicimos después de identificar qué células contienen GCs fue estudiar cuál de las tres posibles vías de transducción se activa en ellas.

5.2.2.1. **Vía de los canales iónicos activados por la unión de nucleótidos cíclicos**

Se ha realizado el estudio de la distribución de diferentes subunidades de CNG en el bulbo olfatorio, en concreto de las subunidades CNGA2 y CNGA3, ya que previamente se han identificado en el sistema olfatorio principal de la rata y a ambas subunidades se les ha atribuido un papel en el procesamiento de la información olfativa. Asimismo, también se ha estudiado la distribución de las subunidades HCN1, HCN2 y HCN4 de los canales iónicos activados por la unión de nucleótidos cíclicos en condiciones de hiperpolarización, puesto que también estos canales podrían actuar como efectores para el GMPc. En todos estos experimentos, primero analizamos el patrón de expresión de las diferentes subunidades en el bulbo olfatorio realizando una caracterización morfológica y neuroquímica completa de las células que las expresan. Después, analizamos la posible implicación de los elementos positivos en la vía de señalización del óxido nítrico y la GCs.

5.2.2.1.1. *Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad A2 de los CNG en el bulbo olfatorio principal*

Cuando se analizó la inmunocitoquímica para CNGA2 en el bulbo olfatorio, se vio que aparecían células marcadas en todas las capas. La distribución de estas células es homogénea por todo el bulbo, aunque su número es ligeramente inferior en la capa de las células granulares (fig 31B).

El tipo celular más abundante que expresa CNGA2 presenta una morfología estrellada, con somas redondeados u ovalados, de donde salen múltiples procesos que no siempre aparecen marcados en toda su extensión. Estas células las encontramos tanto en la capa de los glomérulos olfatorios, como en la capa plexiforme externa, en la región perimitral y en la capa de las células granulares, siendo frecuente encontrarlas próximas a capilares sanguíneos. Según la morfología y la distribución anatómica de estas células, pensamos que podrían ser astrocitos. Para demostrarlo, hicimos un estudio de colocalización de CNGA2 con GFAP. Su análisis a microscopía confocal confirmó que la mayoría de células que contienen CNGA2 también tienen GFAP y son, por tanto, astrocitos (fig 32A-D). Sin embargo, un escaso número de células en la capa de los glomérulos olfatorios, en la capa de las células mitrales y en la capa de las células granulares no presentan GFAP.

Las células que contienen CNGA2 en la capa de los glomérulos olfatorios y que aparentemente no son astrocitos presentan un soma redondeado u ovalado de pequeño tamaño (entre las 8 y las 10 μm), similar al de las células periglomerulares. Para realizar una

caracterización neuroquímica de estas células, se realizaron estudios de doble detección inmunofluorescente donde se analizó la colocalización de CNGA2 con los distintos marcadores de las células periglomerulares (TH, nNOS, CCK, CB y CR). En ningún caso observamos colocalización de CNGA2 y estos marcadores (fig 32E-I). Debido a la inexistencia de CNGA2 en PG2-CB, podemos asumir que CNGA2 no está formando parte en la vía de transducción del óxido nítrico mediante producción de GMPc en los glomérulos olfatorios.

En la capa plexiforme externa, los astrocitos no son el único tipo celular que presenta CNGA2, sino que también aparecen marcadas células con somas más grandes, de entre 15 y 18 μm , y de morfología poligonal (fig 31A). El marcaje presente en estas células de gran tamaño es mucho más tenue que el observado en astrocitos quedando restringido únicamente al soma. Por el tamaño, morfología y localización, estas células son identificadas como células empenachadas. Se realizaron dobles detecciones inmunofluorescentes de GCs con PV, para determinar si alguna interneurona GABAérgica de la capa plexiforme externa expresaba CNGA2. En ningún caso se vio colocalización de los dos marcadores (fig 32J). Las células mitrales aparecen teñidas para CNGA2 en su correspondiente capa (fig 31B; fig 32C,K). El marcaje de las células mitrales es muy similar al descrito anteriormente para las células empenachadas: queda restringido al soma, no es uniforme (tiene un aspecto granuloso, irregular), y es menos intenso. Hemos observado este marcaje al microscopio electrónico con oro coloidal en preinclusión. Analizando el interior de los somas de las células mitrales y empenachadas en este material, vimos que prácticamente todas las partículas de oro coloidal se encontraban asociadas al retículo endoplasmático rugoso de estas células.

En la capa de las células granulares, además de aparecer en los astrocitos, CNGA2 también está presente en una escasa población de células profundas de axón corto que presentan un soma de gran tamaño (entre 15 y 18 μm), y morfología poligonal (fig 31A). En estas células, el marcaje es muy parecido al que vemos en las células mitrales y en las empenachadas de la capa plexiforme externa: mucho menos intenso que en los astrocitos y de aspecto granuloso. Estas células están distribuidas por igual en toda la capa de las células granulares. Se intentó caracterizarlas neuroquímicamente, y para ello se realizaron estudios de doble detección inmunofluorescente de CNGA2 y diferentes sustancias neuroactivas que expresan las células profundas de axón corto: CB, CR, PV, CCK y nNOS. Sólo algunas de las interneuronas que contenían CNGA2, tenían nNOS (fig 32L). Ninguna de las células con CNGA2 contenía ninguno de los otros marcadores. Tampoco se observó que las poblaciones de células granulares que se marcaban con CR y nNOS tuvieran CNGA2 (fig 32K,L).

5.2.2.1.2. *Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad A2 de los CNG en la corriente migratoria rostral*

Cuando se analizó a microscopía óptica la corriente migratoria rostral, se observaron células marcadas (fig 31B). Sin embargo, el patrón celular no se correspondía con el de los

neuroblastos migrantes (descrito anteriormente en el apartado 5.2.1.2.). Para determinar qué tipos celulares estaban expresando CNGA2, analizamos la corriente migratoria rostral a microscopía electrónica. Este análisis confirmó que los neuroblastos migrantes, o células de tipo A, no contenían CNGA2. Sólo encontramos esta subunidad en los astrocitos, o células de tipo B, y en los endimocitos, o células de tipo E (fig 31C).

5.2.2.1.3. *Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad A3 de los CNG en el bulbo olfatorio principal*

La subunidad CNGA3 ha sido clásicamente descrita y caracterizada en las porciones externas de los conos de la retina de vertebrados. Como no hay trabajos previos que analicen la distribución de CNGA3 mediante inmunocitoquímica, antes de comenzar el estudio de su distribución en el bulbo olfatorio principal, decidimos comprobar la especificidad del anticuerpo utilizado en nuestro trabajo realizando una detección inmunocitoquímica de CNGA3 en retina. El análisis a microscopía óptica de estas secciones muestra como el marcaje para CNGA3 se encuentra localizado específicamente en la parte externa de los conos (fig 33A).

Cuando se analiza la inmunocitoquímica para CNGA3 en el bulbo olfatorio, se puede observar que esta subunidad aparece ampliamente distribuida por todas las capas, siendo la capa del nervio olfatorio y la capa plexiforme externa las que aparecen más intensamente teñidas (fig 33B). En la capa del nervio olfatorio pueden observarse marcadas estructuras parecidas a fascículos del nervio olfatorio, desapareciendo el marcaje justo en el límite con la capa de los glomérulos olfatorios (fig 34A,B). Se analizó este patrón de marcaje al microscopio electrónico para ver si la marca correspondía a los perfiles de los axones del nervio olfatorio o si se encontraba en la glía envolvente. Todo el precipitado de DAB apareció en perfiles identificados como glía envolvente, siendo los axones olfatorios claramente negativos (fig 34C-F).

En la capa de los glomérulos olfatorios la marca aparece en dos tipos celulares diferentes morfológicamente (fig 35). La mayoría de las células que aparecen marcadas son células de gran tamaño (de entre 10 y 15 μm), de morfología ovoide o fusiforme y que se encuentran principalmente distribuidas en la zona de la capa glomerular más próxima a la capa plexiforme externa. Estas células presentan una gruesa dendrita apical que penetra en el interior del glomérulo olfatorio. Esta morfología se corresponde con la de las células empenachadas externas (fig 35C,D). El otro tipo celular que aparece marcado, aunque en menor medida, está integrado por células de pequeño tamaño (de entre 5 y 8 μm) y de morfología redondeada, con una dendrita fina que inerva el neuropilo glomerular (fig 35B-D). Estas últimas, según su morfología, se corresponden con células periglomerulares

En el interior del neuropilo glomerular, la inmunorreactividad aparece en grandes troncos dendríticos pertenecientes a las dendritas primarias de las células principales, pero también aparece en otros perfiles más finos, que no pudieron ser identificados utilizando únicamente la

microscopía óptica convencional. Para identificarlos se recurrió a la microscopía electrónica de transmisión. El análisis del neuropilo a microscopía electrónica mostró que la gran mayoría de perfiles marcados correspondían a células principales, tal y como se veía con el microscopio óptico (fig 36): dendritas de gran tamaño y morfología regular, con pocas mitocondrias y microtúbulos perfectamente ordenados. El marcaje en estas dendritas se puede encontrar en el compartimento sensorial y en el compartimento sináptico indistintamente. En el compartimento sensorial, estos perfiles dendríticos reciben contactos sinápticos asimétricos desde el nervio olfatorio. También están recibiendo contactos sinápticos simétricos desde las gémulas de algunas células periglomerulares en ambos compartimentos. Estos perfiles dendríticos, a su vez, realizan contactos sinápticos asimétricos sobre algunas células periglomerulares.

Además de encontrar marcaje en perfiles de células principales, CNGA3 también aparece en perfiles de menor tamaño, morfología más irregular y mayor contenido vesicular. Estos perfiles los encontramos tanto en el compartimento sensorial, donde reciben contactos sinápticos asimétricos desde el nervio olfatorio, como en el sináptico, donde están recibiendo contactos sinápticos asimétricos de las células principales y realizando contactos sinápticos simétricos sobre las mismas. Según estas características ultraestructurales y de conectividad, estos perfiles corresponden a dendritas pertenecientes a células periglomerulares (fig 36E-H). Otro dato que resultó interesante aclarar, fue si la subunidad CNGA3 tenía una localización subcelular concreta dentro de las células que la expresan o si, por el contrario, se encuentra distribuida homogéneamente por toda la célula. Para ello, se realizaron detecciones inmunocitoquímicas de CNGA3 utilizando partículas de oro coloidal en preinclusión. Cuando analizamos la distribución de CNGA3 en perfiles dendríticos correspondientes a células principales, vimos que no tiene una localización preferente, pudiendo encontrarla tanto en el interior del perfil como asociada a la membrana plasmática (fig 36C,F); tampoco parece que tenga una distribución asociada a las especializaciones de los contactos sinápticos, ni en posición presináptica ni postsináptica. Sin embargo, en células periglomerulares vimos que CNGA3 se encuentra mayoritariamente asociada a la membrana plasmática, aunque no parece estar localizada específicamente cerca de contactos sinápticos (fig 36F).

Consideramos interesante determinar la naturaleza GABAérgica de las células periglomerulares positivas a CNGA3; para ello, en secciones ultrafinas de material teñido en preinclusión para CNGA3 con DAB realizamos una detección inmunocitoquímica para GABA en postinclusión utilizando partículas de oro coloidal como marcador. El análisis a microscopía electrónica de este material mostró que existen tanto células periglomerulares GABAérgicas (fig 36G,H), como inmunonegativas para GABA que expresan CNGA3. Para tratar de caracterizar más a qué población o subpoblaciones de células periglomerulares pertenecen las células periglomerulares que contienen CNGA3, recurrimos a la doble detección inmunofluorescente de CNGA3 con diferentes marcadores neuroquímicos de PG1 y PG2. Al

analizar la colocalización de CNGA3 con los marcadores de las subpoblaciones de PG1 (TH, nNOS y CCK) no se vio colocalización con ninguno de ellos (fig 37A-C). Cuando se analizó la colocalización de CNGA3 con los marcadores de las subpoblaciones de PG2 (CR y CB), vimos que la subpoblación de PG2-CR no contenía CNGA3 (fig 37E). Por el contrario, cuando analizamos la colocalización de CNGA3 y CB (fig 37D), vimos que aproximadamente el 17% (para n=234) de células periglomerulares que expresaban CNGA3 contenía CB y que sólo el 5% (para n=646) de las PG2-CB contenían CNGA3.

En la capa plexiforme externa, tanto las células empenachadas externas, como las medias como las internas presentan una inmunorreactividad para CNGA3 (fig 38A-C). El marcaje, sin embargo, no es homogéneo por toda la capa, sino que en la porción más externa, donde la concentración de células empenachadas y sus dendritas marcadas es mayor, aparece mucho más intenso (fig 38A). Aparte de las células principales, en la capa plexiforme externa también hay interneuronas GABAérgicas. Para asegurarnos de que el marcaje para CNGA3 se encontraba sólo en las células empenachadas y no en las interneuronas, se realizaron tres experimentos. En primer lugar, se realizó un estudio de colocalización de CNGA3 con PV (marcador neuroquímico de las interneuronas GABAérgicas de la capa plexiforme externa). En segundo lugar, se realizó un estudio de colocalización con CCK (marcador neuroquímico de células empenachadas). En tercer lugar, se analizó el neuropilo de la capa plexiforme externa a microscopía electrónica. Al estudiar la colocalización de CNGA3 con PV, en ningún caso se observaron dobles marcajes (fig 37F). Por el contrario, al realizar el estudio de colocalización con CCK, vimos que prácticamente había un 100% de colocalización con CNGA3 (fig 37C). Por último, con el análisis a microscopía electrónica de transmisión del neuropilo de la capa plexiforme externa vimos que CNGA3 aparece sólo en dendritas de células principales (fig 39). Estos perfiles reciben contactos sinápticos simétricos desde gémulas pertenecientes a células granulares y a las interneuronas de la capa plexiforme externa, sobre las que también realizan contactos sinápticos asimétricos. Sin embargo, en ninguno de los perfiles identificados como gémulas de células granulares o de interneuronas de la capa plexiforme externa encontramos CNGA3. El análisis de la distribución subcelular de CNGA3 con oro coloidal en las células principales muestra una distribución homogénea por todo el perfil dendrítico (fig 39A).

En la capa de las células mitrales, a microscopía óptica vemos que los somas de las células mitrales aparecen teñidos. El marcaje para CNGA3 también aparece en la dendrita apical y en las dendritas laterales, en toda su trayectoria. Además, también puede observarse marcado el cono axónico y el segmento inicial del axón (fig 38D; fig 40A).

En la capa de las células granulares, CNGA3 aparece en dos tipos celulares claramente diferenciados. Una de las poblaciones celulares que presenta esta subunidad está compuesta por células de gran tamaño (de entre 15 y 18 μm) y morfología globosa o poligonal. Estas células, que se encuentran distribuidas por toda la capa, restringen su marcaje al soma y

porciones muy proximales de las dendritas. Según su tamaño, morfología y disposición, estas interneuronas son células profundas de axón corto (fig 39B-F). Quisimos averiguar algunas de sus características neuroquímicas y, para ello, realizamos un estudio de colocalización de CNGA3 con algunos de los marcadores neuroquímicos de las células profundas de axón corto (CB, CR, PV, nNOS y CCK). En su análisis a microscopía confocal no vimos la existencia de colocalización de CNGA3 con ninguno de ellos.

El otro tipo celular que presenta inmunorreactividad para CNGA3 en la capa de las células granulares está integrado por células de morfología fusiforme y de menor tamaño (entre 9 y 11 μm) que las células profundas de axón corto (fig 40C; fig 41). La distribución de estas células no es homogénea por toda la capa, sino que es más abundante en zonas más profundas, próximas a la sustancia blanca. Estas células presentan uno o dos procesos que se extienden perpendiculares a la laminación del bulbo olfatorio y que apenas se ramifican. La morfología de estas células no se corresponde con la de las células granulares, que no presentan inmunorreactividad para CNGA3. Para comprobar que realmente las células granulares no presentan inmunorreactividad, hicimos dobles detecciones inmunofluorescentes de CNGA3 con algunos de los marcadores de células granulares (nNOS y CR), y no se observó existencia alguna de colocalización (fig 37G,H). Aunque será descrito detalladamente en el siguiente apartado (5.2.2.1.4.), hemos observado que los neuroblastos migrantes, o células de tipo A de la corriente migratoria rostral, expresan CNGA3. Teniendo en cuenta que las células fusiformes que presentan CNGA3 en la capa de las células granulares presentan una morfología similar a la descrita para neuronas inmaduras, y son, además, más abundantes en regiones próximas a la corriente migratoria rostral, sospechamos que estas células debían ser neuroblastos y neuronas inmaduras provenientes de la corriente migratoria rostral y que están en proceso de migración radial en el bulbo olfatorio principal. Para confirmarlo, realizamos una doble detección inmunofluorescente de CNGA3 con doblecortina (marcador neuroquímico de neuronas migrantes). En estos experimentos vimos que existía una colocalización completa (fig 37I).

5.2.2.1.4. *Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad A3 de los CNG en la corriente migratoria rostral*

A microscopía óptica convencional aparecen células inmunorreactivas para CNGA3 en toda la corriente migratoria rostral (fig 42A). Estas células tienen forma esférica en corte transversal y se encuentran agregadas en pequeños grupos o cadenas (fig 42B), normalmente asociadas a vasos sanguíneos. Estas características morfológicas coinciden con la morfología descrita para las células que contienen GCs y, por tanto, con los neuroblastos migrantes o las células de tipo A.

Para confirmar la presencia de CNGA3 en las células de tipo A de la corriente migratoria rostral, realizamos dos estudios diferentes. En el primero de ellos analizamos estas células a

microscopía electrónica y observamos que, efectivamente, son células con características ultraestructurales de neuroblastos migrantes (fig 42C,D): contornos irregulares, separación entre ellas por espacios intercelulares evidentes, abundantes microtúbulos y ribosomas libres y, en el núcleo, abundancia de cromatina laxa y heterocromatina dispersa. En el segundo estudio, realizamos una colocalización de CNGA3 con GCs y doblecortina y vimos que existía 100% de colocalización (fig 37I, fig 42E).

5.2.2.1.5. *Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad 1 de los HCN en el bulbo olfatorio principal*

Un estudio previo al nuestro analiza la distribución de la subunidad HCN1 en la capa glomerular del bulbo olfatorio de la rata (Holderith y col., 2003) pero sin contemplar que estos canales pudieran estar relacionados con una de las vías de transducción del óxido nítrico. En este trabajo, nosotros completamos el análisis de la expresión de HCN1 en todo el bulbo olfatorio y, además, nos centramos en la posible relación existente entre las células que responden al óxido nítrico a través de la GCs y las que expresan HCN1.

Cuando se observa una vista panorámica de una sección de bulbo olfatorio principal después de la inmunocitoquímica para HCN1, la capa que presenta mayor intensidad de marcaje es la capa plexiforme externa y, en menor medida, la capa de los glomérulos olfatorios. La capa de las células mitrales, la capa plexiforme interna y la capa de las células granulares apenas presentan marca (fig 43A).

Cuando analizamos con detalle la capa de los glomérulos olfatorios, observamos que las células que presentan inmunorreactividad para HCN1 son, como ya ha sido previamente descrito (Holderith y col., 2003), las células periglomerulares y las células empenachadas externas (fig 43B). Además, también vimos algunas células con la morfología de células superficiales de axón corto. En su trabajo, Holderith y col. (2003) realizaron una caracterización neuroquímica de las células periglomerulares que contienen HCN1: estos autores describen la presencia de HCN1 en aproximadamente el 10% de células juxtglomerulares; de este porcentaje, menos del 10% son células GABA-inmunonegativas, entre las que se encuentran células periglomerulares pertenecientes a la subpoblación de PG2-CB (el 6% de este total) y células empenachadas externas. El resto de las células son células GABAérgicas que no expresan TH. En este trabajo hemos querido completar la caracterización neuroquímica de las células periglomerulares que expresan HCN1 estudiando si contienen nNOS. Para ello hemos realizado una doble detección inmunofluorescente de HCN1 con nNOS. Al analizar los resultados vimos que existe una colocalización parcial de ambos marcadores, donde el 43% de células inmunorreactivas para HCN1 (n=227) contienen nNOS y aproximadamente el 37% (n=262) de PG1-nNOS contiene HCN1 (fig 43C).

A microscopía óptica, en la capa plexiforme externa no se observa ningún soma marcado (fig 43D); sin embargo, esta capa es la capa que aparece más intensamente teñida, lo que

puede inducir a pensar que HCN1 se encuentra presente en el neuropilo que integra esta capa. Como a microscopía óptica convencional no se puede determinar en qué perfiles aparece, recurrimos a la microscopía electrónica de transmisión. Con el microscopio electrónico vemos tres elementos diferentes marcados. El primer elemento son las dendritas de las células principales (fig 44); también aparece HCN1 en las gémulas de células granulares (fig 45A-C) y en las interneuronas GABAérgicas de la capa plexiforme externa (fig 45D,E).

Algo que tiene en común el patrón de marcaje en los tres tipos celulares donde se expresa HCN1, es que frecuentemente queda asociado a la membrana plasmática y, en ocasiones, próximo a contactos sinápticos. En el análisis de material con oro coloidal en preinclusión a microscopía electrónica se determinó que casi el 95% de las partículas de oro coloidal están asociadas a la membrana plasmática y que, en muchos casos, este oro se encuentra próximo a los contactos sinápticos.

Igual que en la capa plexiforme externa, donde no aparecen cuerpos celulares marcados, tampoco observamos marcaje somático en las células mitrales (fig 43E). En las regiones inframitrales, tan sólo unas pocas células granulares y unas pocas interneuronas profundas de axón corto presentan marcaje en el soma.

5.2.2.1.6. Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad 1 de los HCN en la corriente migratoria rostral

En las secciones analizadas a microscopía óptica convencional, no se observó marcaje de HCN1 en la zona por donde discurre la corriente migratoria rostral. Se realizó igualmente un análisis a microscopía electrónica por si el marcaje era puntual y pudiera estar pasando desapercibido a microscopía óptica. No se observó presencia de HCN1 ni en los neuroblastos migrantes, ni en ningún otro tipo celular de la corriente migratoria rostral.

5.2.2.1.7. Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad 2 de los HCN en el bulbo olfatorio principal

Al realizar la detección inmunocitoquímica de HCN2 en el bulbo olfatorio principal, se observó que las capas que más intensamente aparecían teñidas eran la capa plexiforme externa y la capa de los glomérulos olfatorios. En el resto de capas, a pesar de no presentar un marcaje tan intenso, también se pudo observar la existencia de algunos somas marcados (fig 46A).

Cuando se analiza con detalle la capa de los glomérulos olfatorios lo primero que llama la atención es que no todos presentan el mismo patrón de intensidad de marcaje en el interior del neuropilo, sino que unos aparecen intensamente teñidos, mientras que otros aparecen prácticamente sin tinción. Alrededor de todos los glomérulos aparecen marcados, al menos, dos tipos celulares diferentes: células empenachadas externas y células periglomerulares (fig

46B). Las células empenachadas externas, identificadas por su morfología y tamaño, presentan marcaje en el soma y en las dendritas que penetran en el interior glomerular. Por otra parte, las células periglomerulares, identificadas también por su morfología y su tamaño, presentan marcaje en el soma y pocas veces en las porciones más proximales de las dendritas vistas con el microscopio óptico. Para comprobar si las células periglomerulares presentaban inmunorreactividad para HCN2 en las porciones más distales de sus dendritas dentro del glomérulo olfatorio, lo que hicimos fue analizar a microscopía electrónica de transmisión el neuropilo glomerular prestando especial atención a las gémulas y a las espinas. En el análisis de este material, confirmamos que las dendritas de las células principales presentaban HCN2. Además, también encontramos perfiles positivos de células periglomerulares en ambos compartimentos del glomérulo olfatorio. Algunos de estos perfiles reciben contactos sinápticos asimétricos desde el nervio olfatorio, otros desde las dendritas de las células principales y además realizan contactos sinápticos simétricos sobre las mismas (fig 47). También decidimos estudiar la localización subcelular de HCN2 en el interior de las dendritas. Para ello se realizó una detección inmunocitoquímica utilizando partículas de oro coloidal como marcador. En este material se vio que la mayoría de las partículas se encontraban distribuidas a lo largo de toda la membrana plasmática. Sin embargo, en los perfiles con mayor número de partículas de oro coloidal, también se encuentran en el interior del perfil. No se observa una localización preferencial junto a los contactos sinápticos (fig 47D,E).

A la vista de estos resultados, nos propusimos conocer la naturaleza GABAérgica de las células periglomerulares positivas para HCN2, ya que habíamos visto que reciben contactos desde el nervio olfatorio; para ello, realizamos una detección inmunocitoquímica de GABA en postinclusión. El análisis de este material a microscopía electrónica, mostró que existen células periglomerulares inmunorreactivas para HCN2, que son GABAérgicas (fig 47C), y otras GABA-inmunonegativas. Lo siguiente que nos planteamos fue realizar una la caracterización neuroquímica completa de las células periglomerulares que contienen HCN2 utilizando los marcadores neuroquímicos para las subpoblaciones de PG1 (nNOS, TH y CCK) y PG2 (CR y CB). En ningún caso, vimos colocalización (fig 48).

Al analizar a microscopía óptica la capa plexiforme externa, vimos la existencia de marcaje en los somas de las células empenachadas; además, se observa cómo también el neuropilo es inmunorreactivo (fig 46D). Para determinar en qué elementos del neuropilo de la capa plexiforme externa se encontraba la HCN2, realizamos un análisis de esta capa a microscopía electrónica utilizando partículas de oro coloidal en preinclusión. Principalmente, encontramos partículas de oro coloidal en dendritas de células principales (fig 49) y en gémulas y varicosidades de las interneuronas GABAérgicas de la capa plexiforme externa (fig 50A,B). En estos perfiles, las partículas de oro coloidal se encuentran preferentemente asociadas a la membrana plasmática, pero no a los contactos sinápticos. No se observaron

partículas de oro coloidal en perfiles que pudieran ser identificados como gémulas de las células granulares (fig 50C-F).

En la capa de las células mitrales, todas las células presentan un intenso marcaje tanto en el soma, como en la dendrita apical, en las dendritas laterales y en el cono axónico. En la capa de las células granulares, la mayoría de las células granulares presentan marcaje en el soma (fig 46C). Además, aparecen marcadas unas pocas interneuronas de gran tamaño identificadas como células profundas de axón corto.

5.2.2.1.8. Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad 2 de los HCN en la corriente migratoria rostral

Un análisis de la sustancia blanca a microscopía óptica convencional basta para observar que existe inmunoreactividad para HCN2 en la corriente migratoria rostral, sin embargo, las células marcadas no presentan la morfología ni la disposición en cadena típica de las células de tipo A. A microscopía electrónica vimos que HCN2 estaba presente en las células de tipo B pero no lo observamos en ninguno de los neuroblastos migrantes, o células de tipo A.

5.2.2.1.9. Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad 4 de los HCN en el bulbo olfatorio principal

Después de realizar la detección inmunocitoquímica para HCN4 en el bulbo olfatorio principal, se observa un patrón de marcaje muy similar al visto para HCN1 y HCN2, donde la capa más intensamente teñida es la capa plexiforme externa y, después, la capa de los glomérulos olfatorios (fig 51A).

En los glomérulos olfatorios se observa una gran cantidad de elementos positivos en la región periglomerular, incluyendo algunas células periglomerulares y algunas células empenachadas externas (fig 51B,C). El marcaje aparece en somas y dendritas. Analizando el neuropilo glomerular a microscopía electrónica, vimos que HCN4 aparecía en perfiles dendríticos que pertenecían a células principales y a células periglomerulares (fig 52A-C). Los perfiles correspondientes a las células periglomerulares HCN4-inmunorreactivas se distribuyen tanto por el compartimento sensorial como por el sináptico. Además, vimos que algunas de estas células reciben contactos sinápticos asimétricos desde el nervio olfatorio. Visto que tanto HCN1 como HCN2 aparecían íntimamente asociados a la membrana plasmática y teniendo en cuenta el marcaje tan discreto que presenta HCN4 a microscopía óptica, decidimos analizar si esta subunidad también presentaba una localización subcelular específica. Para ello, realizamos la detección de HCN4 con partículas de oro coloidal. Su análisis a microscopía electrónica muestra una localización próxima a membrana plasmática, pero no asociada a contactos sinápticos (fig 52B).

Una vez visto esto, analizamos su naturaleza GABAérgica. Para ello, realizamos una detección de GABA en postinclusión sobre secciones donde previamente se había detectado HCN4 con DAB. El análisis de estas secciones mostró que existen células periglomerulares que expresan HCN4 y que son GABAérgicas (fig 52C) y otras que no presentan inmunorreactividad para GABA. A la vista de estos datos decidimos realizar una caracterización neuroquímica de las células periglomerulares que expresaban HCN4. Para ello, realizamos estudios de colocalización con los marcadores para las subpoblaciones de PG1 (nNOS, TH y CCK) y PG2 (CB y CR). No observamos colocalización de HCN4 con ninguno de estos marcadores (fig 53A-D).

En el análisis detallado de la capa plexiforme externa, no encontramos ningún soma inmunorreactivo para HCN4, pero sí perfiles dendríticos (fig 51D). La distribución del marcaje es homogénea por toda la capa plexiforme externa. El marcaje aparece perfilando únicamente la superficie dendrítica. Para identificar los elementos del neuropilo donde aparece HCN4, se procedió a su análisis a microscopía electrónica con oro coloidal. En este material vimos que HCN4 se encontraban en dendritas de las células principales, en algunas gémulas de células granulares y en los perfiles identificados como gémulas y varicosidades de las interneuronas de la capa plexiforme externa (fig 52D,E). En todos los casos las partículas de oro se vieron asociadas a la membrana, aunque no a contactos sinápticos.

Cuando analizamos la capa de las células mitrales, no vimos que estas células presentaran marcaje en el soma (fig 51E). En la capa de las células granulares el marcaje aparece con claridad en algunos somas celulares de granos y en algunas células profundas de axón corto (fig 51F). Estas células se encuentran principalmente situadas en la zona más profunda de la capa y son dobles con nNOS (fig 53E). En la capa más profunda, en la sustancia blanca, también aparecen marcadas unas células de mayor tamaño, de entre 25 y 30 μm , que presentan una morfología ovoide o piriforme y que, además, expresan CB (fig 53F). Según esta descripción morfológica, de localización y caracterización neuroquímica, estas últimas células descritas se corresponden con las células gigantes.

5.2.2.1.10. *Distribución y caracterización de las células que contienen la subunidad 4 de los HCN en la corriente migratoria rostral.*

En el análisis de la corriente migratoria rostral a microscopía óptica convencional no se observaron elementos positivos para HCN4. Aún así se realizó su análisis a microscopía electrónica. No se observó marcaje para HCN4 ni en los neuroblastos migrantes ni en ningún otro tipo celular de la corriente migratoria rostral.

5.2.2.2. **Vía de las proteínas kinasas dependientes de GMPc**

Estudios previos al nuestro describen la presencia de PKG1 β y PKG2 en el bulbo olfatorio principal (Feil y col., 1995; de Vente y col., 2001), aunque sin detallar en qué elementos de la

circuitería. En estos trabajos, además, se observó que ambas PKG se expresaban en las células de Purkinje y, la PKG2, en la habénula medial. Nosotros hemos realizado el estudio detallado de la distribución de PKG1 β y PKG2 analizando su posible relación con la vía de señalización del óxido nítrico mediante la activación de la GCs y, por tanto, mediante la producción de GMPc. Paralelamente a los estudios realizados en el bulbo olfatorio principal, también se realizaron, como control de los anticuerpos, estudios de detección inmunocitoquímica en el cerebelo y en la habénula medial.

5.2.2.2.1. Distribución y caracterización de las células que contienen la isoforma β de la PKG1 en el bulbo olfatorio principal

Cuando se analiza la inmunocitoquímica para PKG1 β , se puede observar que aparece ampliamente distribuida por todas las capas del bulbo olfatorio principal, siendo la capa plexiforme externa la que aparece más intensamente teñida (fig 54A). En la capa de los glomérulos olfatorios, observamos células marcadas que se disponen alrededor de cada glomérulo. Estas células presentan la morfología típica de las células empenachadas externas y de las células periglomerulares (fig 54B-D). En el interior del neuropilo glomerular pueden verse marcados algunos procesos dendríticos de gran tamaño, procesos que claramente pertenecen a células principales. También se observa un marcaje difuso en elementos más pequeños para cuya identificación acudimos a la microscopía electrónica. Este estudio confirmó la presencia de la PKG1 β tanto en dendritas de células principales como en dendritas de células periglomerulares (fig 54 E-H). Las células periglomerulares PKG1 β -inmunopositivas se encontraban en ambos compartimentos del neuropilo. En el compartimento sensorial vemos que estas células están recibiendo contactos sinápticos asimétricos desde el nervio olfatorio. Analizamos, por ello, la naturaleza GABAérgica de estas células mediante la detección de GABA en postinclusión sobre secciones ultrafinas previamente teñidas para PKG1 β con DAB. En el análisis de estas secciones a microscopía electrónica vimos algunas células periglomerulares PKG1 β -inmunopositivas que son GABAérgicas (fig 54H), mientras que otras no presentan inmunorreactividad para GABA.

A la vista de estos datos, tratamos de caracterizar las células periglomerulares neuroquímicamente. Para ello, realizamos estudios de colocalización de PKG1 β con los marcadores para las subpoblaciones de PG1 (nNOS, TH y CCK) y PG2 (CB y CR). No vimos que existiera colocalización con ninguno de los marcadores de las subpoblaciones de PG1. Tampoco vimos colocalización con PG2-CB. Sin embargo, sí que vimos colocalización con CR (fig 55).

La capa plexiforme externa es la capa que aparece teñida de forma más intensa. En ella, además, pueden observarse dos zonas claramente diferenciables: la parte externa próxima a la capa de los glomérulos olfatorios presenta mayor inmunorreactividad que la parte interna, próxima a la capa de las células mitrales. En la parte externa, pueden observarse marcadas

las células empenachadas y sus dendritas. En la parte interna, podemos apreciar también algunas células empenachadas, pero sobre todo aparecen perfiles dendríticos (fig 56A,B). Algunos de estos perfiles corresponden a las dendritas apicales de las células mitrales que ascienden perpendicularmente a la laminación del bulbo olfatorio hasta que penetran en el interior glomerular. En el neuropilo de la capa plexiforme externa, al presentar las dendritas de las células principales un marcaje tan intenso, podríamos pasar por alto un posible marcaje en el resto de elementos que lo componen. Para comprobar si PKG1 β únicamente está presente en células principales, analizamos el resto del neuropilo a microscopía electrónica. En este análisis observamos que los perfiles correspondientes a células principales aparecían marcados; además, no observamos marcaje en los perfiles que se identificaron como gémulas de células granulares ni en las varicosidades de las interneuronas de la capa plexiforme externa (fig 56E,F).

Al seguir analizando la presencia de PKG1 β en el resto de capas del bulbo olfatorio, observamos que todas las células mitrales presentan inmunorreactividad. El marcaje aparece tanto en el soma, como en sus dendritas apical y laterales, y en el segmento inicial del axón (fig 56C,D). En la capa de las células granulares, prácticamente todas las células granulares aparecen marcadas. El marcaje aparece tanto en soma como en la dendrita apical, dirigida hacia la capa plexiforme externa. Además, algunas interneuronas profundas de axón corto presentan inmunorreactividad para PKG1 β . El tamaño, la morfología y la distribución de estas interneuronas a través de la capa no es homogénea, así como tampoco es homogénea la distribución del marcaje en el interior celular. Algunas se encuentran en la parte más superficial de la capa, próximas a las células mitrales; el tamaño de su cuerpo celular, generalmente de morfología redondeada, es ligeramente mayor que el de las células granulares, oscilando entre las 10 y las 12 μm ; estas células sólo presentan inmunorreactividad en su soma. Otras células, de mayor tamaño (de entre 13 y 15 μm), presentan una morfología mucho más irregular y su tinción se extiende parcialmente por las dendritas. Trataron de caracterizarse neuroquímicamente por lo que se realizaron dobles marcajes de PKG1 β con algunos marcadores neuroquímicos de las células profundas de axón corto (CB, nNOS, CCK, PV). No se vio colocalización con ninguno de ellos.

5.2.2.2.2. *Distribución y caracterización de las células que contienen la isoforma β de la PKG1 en la corriente migratoria rostral*

En el análisis de la corriente migratoria rostral del bulbo olfatorio principal, se observaron algunas células marcadas. Analizamos este patrón de marcaje a microscopía electrónica y observamos que la marca para PKG1 β se encontraba en los astrocitos o células de tipo B. En ningún caso vimos marcaje en los neuroblastos o células de tipo A.

5.2.2.2.3. *Distribución y caracterización de las células que contienen PKG2 en el bulbo olfatorio principal*

Hemos utilizado dos anticuerpos comerciales diferentes para la PKG2 que son funcionales en detecciones inmunocitoquímicas: uno de ellos desarrollado contra el extremo N-terminal de la enzima, y el otro contra su extremo C-terminal. El estudio de distribución y caracterización de las células que contienen PKG2 se realizó utilizando ambos anticuerpos; obteniéndose, en ambos casos, el mismo patrón de distribución.

En el análisis a microscopía óptica de la distribución de PKG2, vemos, a pocos aumentos, que prácticamente no aparece ningún elemento marcado (fig 57A). Cuando las secciones se analizan más detalladamente, observamos, sin embargo, que existe un patrón de marcaje punteado en todas las capas (fig 57B,C). Para analizarlo, utilizamos la microscopía electrónica de transmisión. Con ella vimos que los perfiles donde encontramos inmunorreactividad para PKG2 corresponden a procesos de células gliales (fig 57D,E). No encontramos PKG2 en ninguna neurona del bulbo olfatorio. Para confirmar que este marcaje es específico y los anticuerpos funcionaban correctamente, comprobamos que tanto las células de Purkinje como la habénula medial presentaban el marcaje que previamente había sido descrito en estas regiones por (Feil y col., 1995; de Vente y col., 2001) (fig 57F,G).

5.2.2.2.4. *Distribución y caracterización de las células que contienen PKG2 en la corriente migratoria rostral*

A microscopía óptica, aparecía alguna célula marcada en la región de la corriente migratoria rostral, aunque no con la morfología típica de las células de tipo A. Su análisis a microscopía electrónica muestra que son células de tipo B las que presentan inmunorreactividad para PKG2. En ningún caso vimos que los neuroblastos, o células de tipo A presentaran marcaje.

5.2.2.3. **Vía de las fosfodiesterasas de los nucleótidos cíclicos**

De las 11 familias de PDE que existen, hemos estudiado la PDE5, por distintas razones ya argumentadas en la introducción.

5.2.2.3.1. *Distribución y caracterización de las células que contienen la PDE5 en el bulbo olfatorio principal*

En el análisis a microscopía óptica de la inmunocitoquímica para PDE5, son la capa plexiforme externa y la capa de las células granulares las que mayor tinción presentan (fig 58A). Cuando analizamos capa por capa el patrón de expresión de PDE5, vemos algo que es común en todas ellas: el tipo de marcaje que presenta la PDE5 en los elementos positivos no es continuo, sino punteado.

En la capa de los glomérulos olfatorios, pueden verse marcadas dendritas pertenecientes a las células principales penetrando en el interior de los glomérulos olfatorios (fig 58B). También se observan unos procesos muy finos en el interior glomerular. Para identificarlos utilizamos la microscopía electrónica de transmisión. Con ella pudimos confirmar que PDE5 se encuentra en las dendritas de células principales y que, además, también se encuentra en algunas dendritas de células periglomerulares, tanto en el compartimento sensorial, donde reciben contactos sinápticos asimétricos desde el nervio olfatorio, como en el sináptico (fig 59A-D).

Después de comprobar la existencia de PDE5 en células periglomerulares, decidimos realizar la caracterización neuroquímica de las mismas. Para ello, primero se realizaron estudios de colocalización de PDE5 con los marcadores neuroquímicos de las diferentes subpoblaciones de PG1 (TH, nNOS, CCK) y PG2 (CB y CR) usando marcajes fluorescentes. El análisis a microscopía confocal de estas muestras no nos permitió concretar la existencia de colocalizaciones o no colocalizaciones, debido al aspecto punteado que presenta la PDE5 y a la dificultad que presentó su detección a microscopía de fluorescencia y confocal. Por ello, para analizar si PDE5 se estaba expresando en células periglomerulares que contuvieran GCs, realizamos una doble detección inmunocitoquímica en preinclusión utilizando oro coloidal y DAB como marcadores para PDE5 y GCs, respectivamente. En el análisis a microscopía electrónica de este material, vimos que existen perfiles de células periglomerulares con GCs que también contienen PDE5 (fig 59E,F).

A microscopía óptica, en la capa plexiforme externa, vemos dos zonas claramente diferenciadas. En la zona más próxima a la capa de las células mitrales hay menos elementos marcados, mientras que en el tercio superior, próximo a la capa de los glomérulos olfatorios, aparece más marcaje. En ambas zonas aparecen marcados grandes troncos dendríticos que, sin duda, pertenecen a células principales. Algunas de ellas se ven atravesando perpendicularmente la capa plexiforme externa y penetrando en los glomérulos olfatorios (fig 58A). En la capa plexiforme externa, no aparece marcado ningún soma; tampoco en la capa de las células mitrales (fig 58C). El análisis a microscopía electrónica del neuropilo de la capa plexiforme externa confirmó que sólo las células principales contenían PDE5 (fig 59G,H).

La capa de las células granulares es la que muestra mayor inmunoreactividad para PDE5. En ella aparecen marcadas las dendritas apicales de las células granulares. En la capa de la sustancia blanca también aparecen algunas células marcadas, células de gran tamaño (entre 25 y 30 μm), de morfología más bien fusiforme, con largas dendritas que se prolongan y ramifica por toda la capa con una disposición paralela a la laminación. Según esta morfología y localización, podemos identificarlas como células gigantes.

5.2.2.3.2. *Distribución y caracterización de las células que contienen PDE5 en la corriente migratoria rostral*

Cuando analizamos a microscopía óptica la zona donde se ubica la corriente migratoria rostral, no aparecen células inmunorreactivas para PDE5. Realizamos, sin embargo, su análisis a microscopía electrónica de transmisión, donde comprobamos que ni los neuroblastos migrantes, células de tipo A, ni ninguno de los otros tipos celulares integrantes de la corriente migratoria rostral, expresaban PDE5.

5.3. VÍA DE ACTUACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO MEDIANTE LA NITROSILACIÓN DE PROTEÍNAS

Mediante la detección inmunocitoquímica de proteínas nitrosiladas, podremos averiguar qué células del bulbo olfatorio responden al óxido nítrico por esta vía de actuación.

Se han realizado estudios previos de detección inmunocitoquímica de proteínas nitrosiladas en la zona subventricular y en la corriente migratoria rostral, por lo que, como medida de control de los anticuerpos empleados, al mismo tiempo que hicimos las detecciones inmunocitoquímicas de células con proteínas nitrosiladas en secciones del bulbo olfatorio principal, también las hicimos en secciones de la zona subventricular como control (fig 60D,E).

Cuando se analiza el bulbo olfatorio principal en este material, vemos que todas las capas aparecen libres de marca. Únicamente al analizar la corriente migratoria rostral y la zona subventricular, observamos unas pocas células marcadas. El marcaje de estas células era tan débil y tan sutil, que prácticamente no podemos describirlas morfológicamente ni decir a qué tipo celular corresponden (fig 60A-C).

5.4. RELACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO CON EL SISTEMA DE TRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICO

Como vimos en la introducción, el óxido nítrico actúa regulando la liberación de algunos neurotransmisores, entre ellos la dopamina (Hanbauer y col., 1992). Se ha descrito que la dopamina influencia la transmisión del input olfatorio (Hsia y col., 1999; Berkowickz y Trombley, 2000) y modula la actividad de las células mitrales (Ducham-Viret y col., 1997). Si tenemos en cuenta que en los glomérulos olfatorios coexisten células productoras de óxido nítrico (PG1-nNOS) y células productoras de dopamina (PG1-TH), es fácil pensar que la transmisión dopaminérgica podría estar regulada por óxido nítrico. Por esta razón vamos a estudiar la posible relación de ambos sistemas. El óxido nítrico podría estar actuando sobre los circuitos dopaminérgicos a tres niveles diferentes. En primer lugar, podría estar modulando la transmisión dopaminérgica activando la vía de la GCs en las células productoras de dopamina. Como ya ha sido anteriormente descrito (apartado 5.2.1.1.1.), no se encontró GCs en estas células

periglomerulares, por lo tanto descartamos esta forma de actuación. En segundo lugar, podría estar actuando directamente sobre la dopamina, ya que algunos trabajos previos han demostrado que puede existir nitrosilación de la dopamina (Kytzia y col., 2006; Nappi y Vass, 2001). Para resolver este punto, hemos realizado un estudio para determinar si se produce nitrosilación de la dopamina en el bulbo olfatorio. Para ello, realizamos una detección inmunocitoquímica de dopamina nitrosilada utilizando un anticuerpo comercial. El análisis de este material con el microscopio óptico y el microscopio electrónico, mostró la ausencia marca en el bulbo olfatorio. Por último, otro de los posibles mecanismos de acción del óxido nítrico para modular la transmisión dopaminérgica, es actuar sobre las dianas de la dopamina. Hemos analizado en detalle este punto.

En algunos estudios previos (Wamsley y col., 1989; Mansour y col., 1990; Levey y col., 1993; Coronas y col., 1997) se ha visto una elevada cantidad de receptor D2 de dopamina en los glomérulos olfatorios utilizando la técnica de autorradiografía. Además, en algunos trabajos, se ha hipotetizado con la presencia del receptor D2 de dopamina en distintos elementos del neuropilo glomerular: 1) se ha detectado RNAm en las neuronas receptoras de los olores (Koster y col., 1999); 2) estudios de electroforesis respaldan una acción presináptica del receptor D2 de dopamina en los terminales axónicos del nervio olfatorio (Hsia y col., 1999; Berkowicz y Trombley, 2000; Ennis y col., 2001); 3) se ha detectado RNAm de los receptor D2 de dopamina en una población de células periglomerulares (Mansour y col., 1990); 4) experimentos de cultivos de células mitrales sugieren la presencia del receptor D2 de dopamina en estas células (Dávila y col., 2003). Ninguno de estos trabajos, sin embargo, proporciona suficiente resolución para determinar la localización subcelular específica de este receptor en el interior del neuropilo glomerular. De manera que lo primero que nos propusimos fue describir la localización subcelular detallada del receptor D2 de dopamina en los elementos del neuropilo glomerular. Para ello, realizamos la detección inmunocitoquímica del receptor D2 de dopamina utilizando oro coloidal en preinclusión como marcador. En el análisis de estas secciones al microscopio óptico convencional, a pocos aumentos no se vio ningún tipo de marcaje. Sin embargo, al estudiar las distintas capas con mucho mayor detalle vimos una marca específica en el interior de los glomérulos olfatorios; este marcaje aparece como un punteado homogéneo en el interior de todos los glomérulos (fig 61A). La marca no pudo ser identificada con el microscopio óptico, de manera que hubo que recurrir a la microscopía electrónica de transmisión. En el análisis a microscopía electrónica de estas secciones, vimos que el receptor D2 de dopamina aparece tanto en el compartimento sensorial como en el compartimento sináptico. Fue encontrado en tres elementos de la circuitería glomerular: en los terminales axónicos del nervio olfatorio, en perfiles dendríticos de las células principales y en las gémulas de algunas células periglomerulares.

En los terminales axónicos del nervio olfatorio, el receptor D2 de dopamina está claramente asociado a la membrana plasmática (el 92% de las partículas de oro coloidal, para $n=100$) y, frecuentemente, sobre los contactos sinápticos, con una distribución claramente

presináptica (fig 61B-H). Lo hemos encontrado asociado a los contactos del nervio olfatorio sobre células periglomerulares y sobre células principales. En las dendritas de las células principales, el receptor D2 de dopamina puede encontrarse tanto asociado a la membrana plasmática (el 55% de las veces para n=100), como en el interior del citoplasma dendrítico (el 45% de los casos para n=100). Cuando se encontró asociado a la membrana plasmática, frecuentemente se localizaba en las especializaciones sinápticas, o en la región perisináptica de los contactos sinápticos asimétricos que las células principales realizaban sobre las células periglomerulares. Siempre lo hemos encontrado en posición presináptica y nunca lo hemos visto en posición postsináptica en las sinapsis simétricas que las células principales reciben desde las células periglomerulares (fig 62). Tampoco se encontraron partículas de oro coloidal con localización postsináptica en las sinapsis asimétricas que las células principales estaban recibiendo desde el nervio olfatorio. En las pocas células periglomerulares donde aparece el receptor D2 de dopamina, las partículas de oro coloidal preferentemente se encuentran en el citoplasma dendrítico (el 72% de partículas para n=100). Cuando las partículas se observaron unidas a membrana plasmática (el 28% de los casos para n=100), siempre estaban en la especialización presináptica de los contactos sinápticos simétricos que realizan sobre las células principales. Nunca se encontraron partículas de oro coloidal en posición postsináptica en los contactos sinápticos asimétricos que reciben desde las células principales (fig 63). Algunas de estas células periglomerulares que contienen receptor D2 de dopamina estaban recibiendo contactos sinápticos asimétricos desde los terminales axónicos del nervio olfatorio; las partículas de oro tampoco se vieron a nivel postsináptico en estos contactos.

Teniendo en cuenta este último punto, estudiamos la naturaleza GABAérgica de las células periglomerulares que contienen el receptor D2 de dopamina; para ello, realizamos una detección inmunocitoquímica de GABA en postinclusión, utilizando oro coloidal de 10 nm de diámetro como marcador, sobre material donde previamente habíamos detectado receptor D2 de dopamina en preinclusión con oro amplificado con plata. Parte de las células periglomerulares inmunopositivas para el receptor D2 de dopamina resultaron ser GABAérgicas (fig 64A,B). Según estos datos, al menos una parte de las células periglomerulares que contienen el receptor D2 de dopamina forman parte de la población de PG1.

Para caracterizar neuroquímicamente con más detalle en qué subpoblaciones de células periglomerulares se estaba expresando el receptor D2 de dopamina, realizamos dobles detecciones inmunocitoquímicas para el receptor D2 de dopamina y los marcadores de las distintas subpoblaciones de PG1 (TH, nNOS, CCK) y PG2 (CB y CR) utilizando como marcador para el receptor D2 de dopamina partículas de oro coloidal y DAB para el resto de marcadores. Cuando analizamos los dobles marcajes para el receptor D2 de dopamina y la TH, vimos que parte de las PG1-TH también contenían el receptor D2 de dopamina, (fig 64C-E). También vimos colocalización del receptor de dopamina D2 con CB. Por último, también analizamos la existencia del receptor D2 de dopamina en células que contenían GCs confirmando que algunas de las

células periglomerulares que contenían GCs también expresaban el receptor D2 de dopamina (fig 64F,G). Con esto demostramos que el óxido nítrico puede estar influenciando la transmisión dopaminérgica a través de las células periglomerulares dopaminoceptivas que contienen GCs.

FIGURAS

Figura 20. **Distribución de nNOS en el bulbo olfatorio principal.**

La mayor parte de células nNOS-inmunopositivas se encuentra en la capa de los glomérulos olfatorios (CGL) y en la capa de las células granulares (CGR). En la capa de los glomérulos olfatorios la mayoría de elementos positivos se corresponde con células periglomerulares. También puede apreciarse una célula superficial de axón corto débilmente teñida (cabeza de flecha). En la capa de las células granulares vemos que dos poblaciones distintas de interneuronas expresan nNOS. Una de estas poblaciones corresponde a una subpoblación de células granulares (flechas); el resto corresponde a células profundas de axón corto (flechas abiertas).

CPE: capa plexiforme externa; CM: capa de las células mitrales. Barra de escala: 50 μ m.

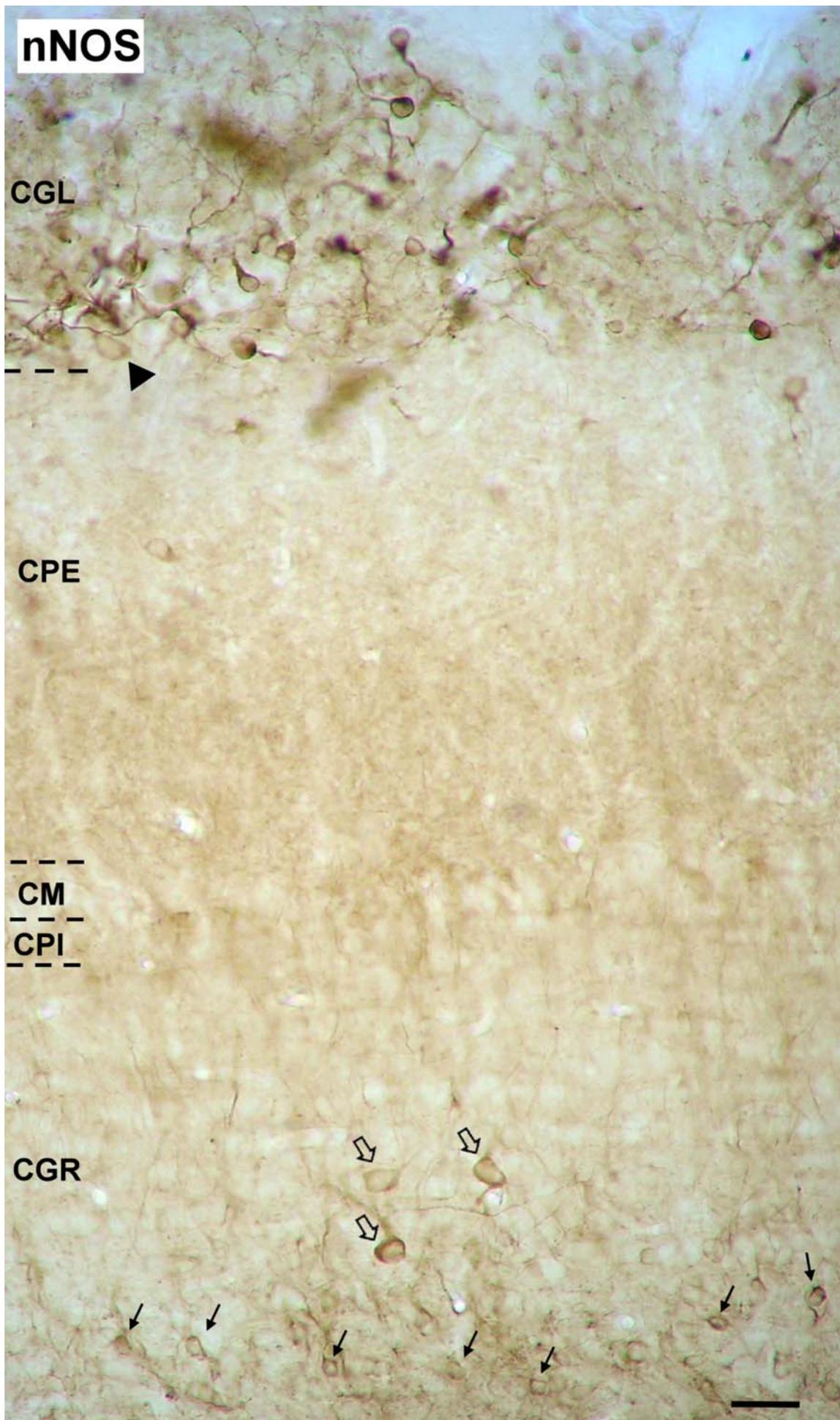


Figura 21. Análisis a microscopía electrónica del marcaje para nNOS en el interior del neuropilo glomerular.

Las dendritas de las células periglomerulares nNOS-inmuno-reactivas (PG) se encuentran distribuidas por todo el neuropilo glomerular, por lo que podemos encontrarlas tanto en el compartimento sensorial (A y D) como en el sináptico (B,C,E y F).

(B) En el compartimento sináptico, se observa una célula periglomerular (PG) recibiendo un contacto sináptico (flecha abierta) desde una célula principal (M/E).

(C) También reciben contactos sinápticos (flecha abierta) desde axones de origen desconocido, probablemente centrífugo (Ax).

(D-F) Análisis de la distribución subcelular específica de nNOS utilizando oro coloidal (cabezas de flecha). En (D) vemos como el oro se encuentra próximo a la sinápsis asimétrica (flecha abierta) que el nervio olfatorio (NO) realiza sobre la célula periglomerular (PG). En (E) y en (F) el oro se encuentra directamente sobre la especialización postsináptica de contactos sinápticos asimétricos (flechas abiertas) que las células periglomerulares (PG) están recibiendo desde células principales (M/E).

Barras de escala: 500 nm.

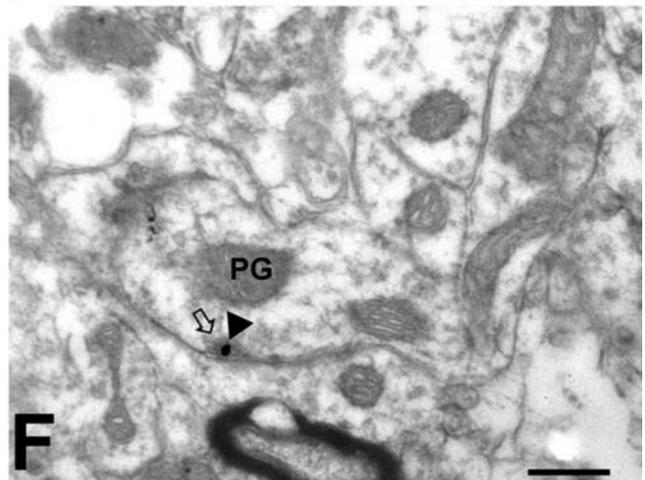
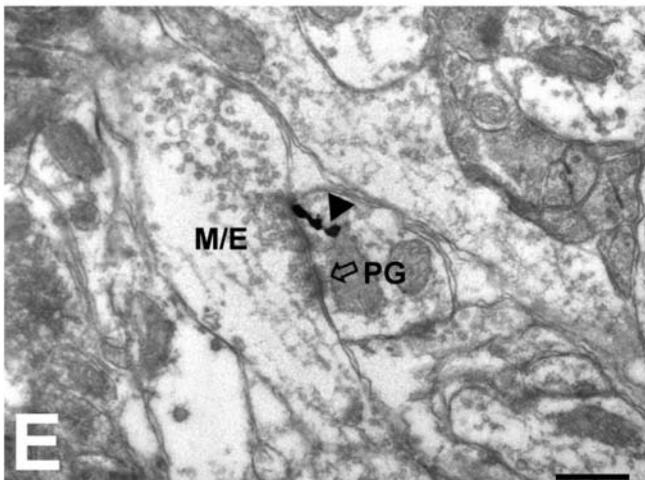
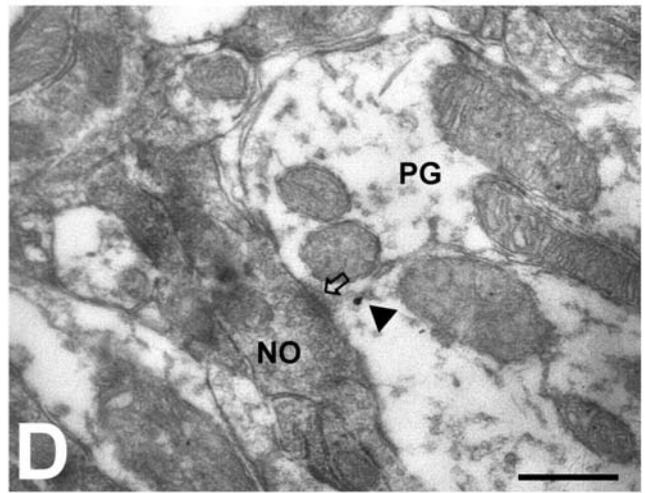
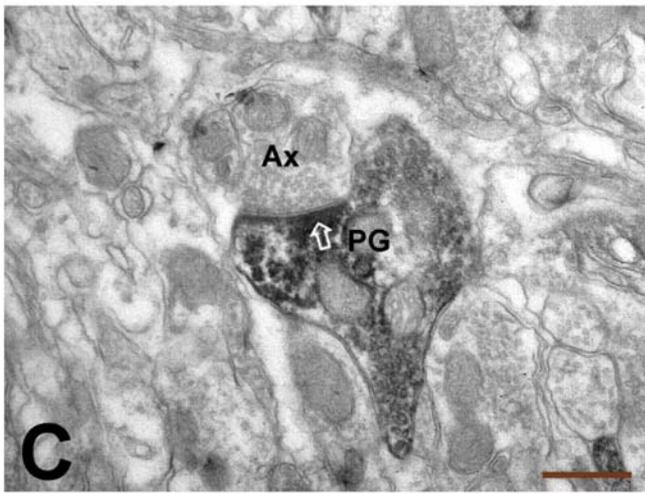
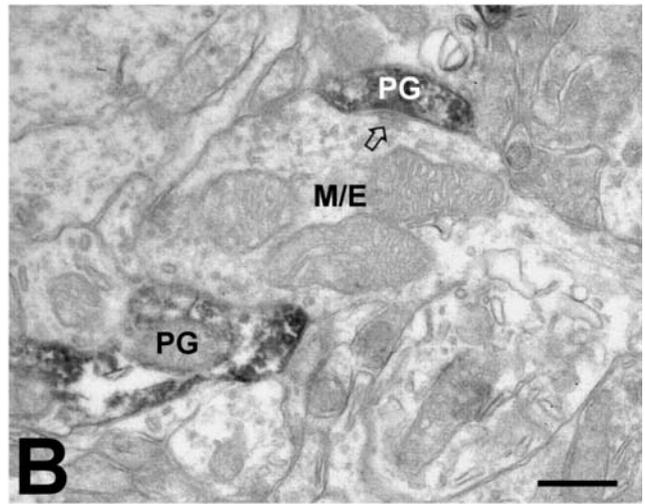
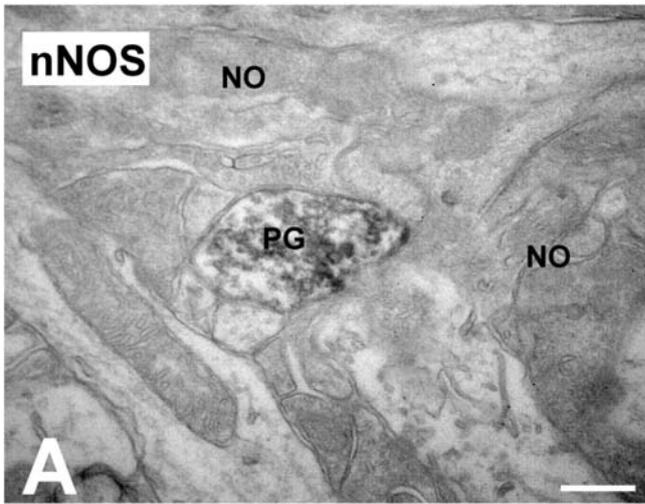


Figura 22. Distribución de GCs en el bulbo olfatorio principal.

(A): Imagen semipanorámica del bulbo olfatorio donde puede observarse que los elementos GCs-inmunopositivos se encuentran homogéneamente distribuidos por toda la capa de los glomérulos olfatorios (CGL). En la capa de las células granulares (CGR) aparece alguna célula profunda de axón corto débilmente teñida (flecha) y prolongaciones radiales que se extienden a través de la capa plexiforme interna (CPI).

(B) y (C): Las células inmunorreactivas de la capa de los glomérulos olfatorios se distribuyen preferentemente por la zona más próxima a la capa plexiforme externa y tienen la morfología típica de las células periglomerulares.

(D): En la capa plexiforme externa también se observa alguna célula inmunorreactiva para GCs (flecha).

(E) y (F): Estas células también tienen morfología de células periglomerulares y se corresponden con células periglomerulares desplazadas.

CNO: capa del nervio olfatorio; CM: capa de las células mitrales. Barras de escala: (A) 100 μm ; (B) 25 μm ; (C,D) 15 μm ; (E,F) 5 μm .

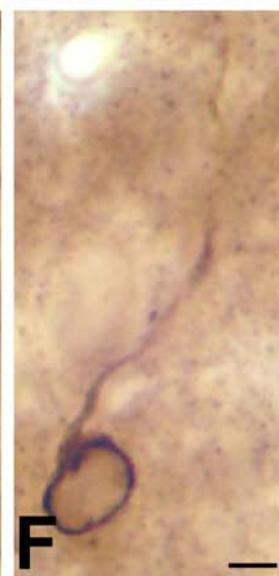
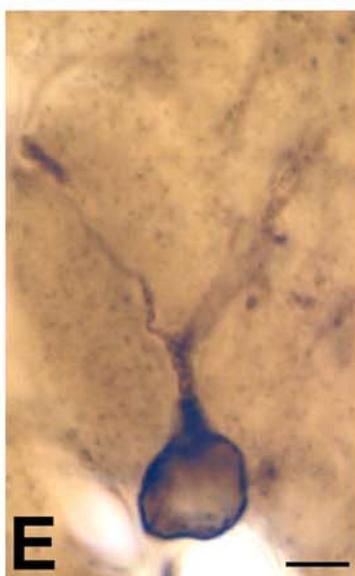
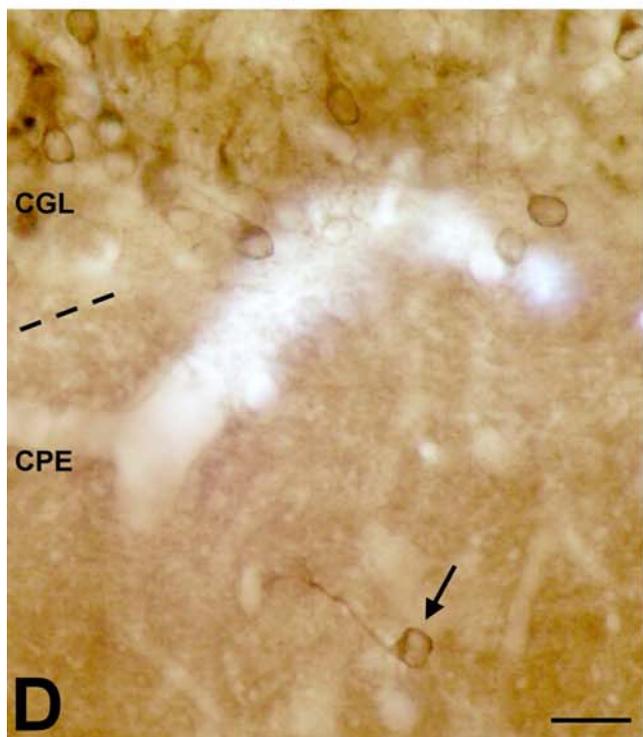
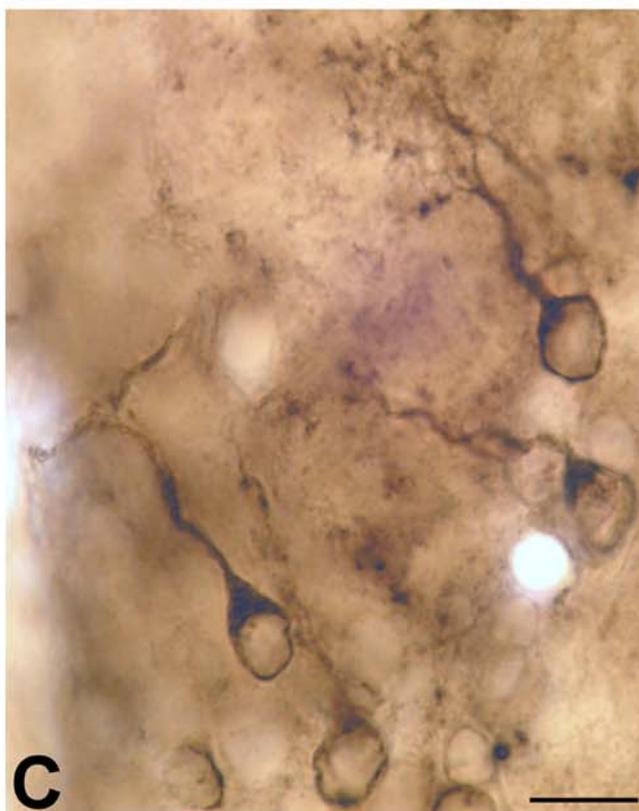
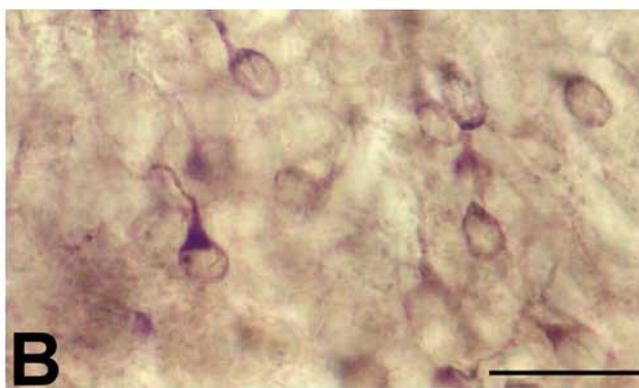
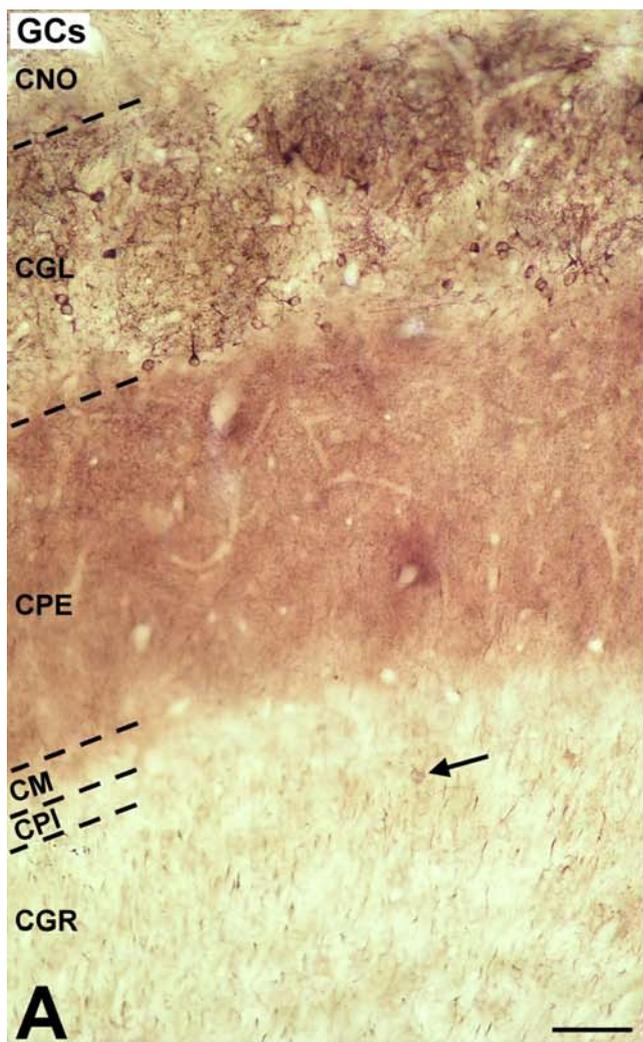


Figura 23. Vista semipanorámica de la distribución de los elementos que contienen GCs en el neuropilo glomerular, analizada a microscopía electrónica.

Los elementos que contienen GCs (flechas abiertas) se encuentran distribuidos por el compartimento sináptico del neuropilo glomerular. Puede observarse que ninguno de estos elementos se encuentra dentro del compartimento sensorial (zonas delineadas y marcadas con asteriscos).

Barra de escala: 2 μm .

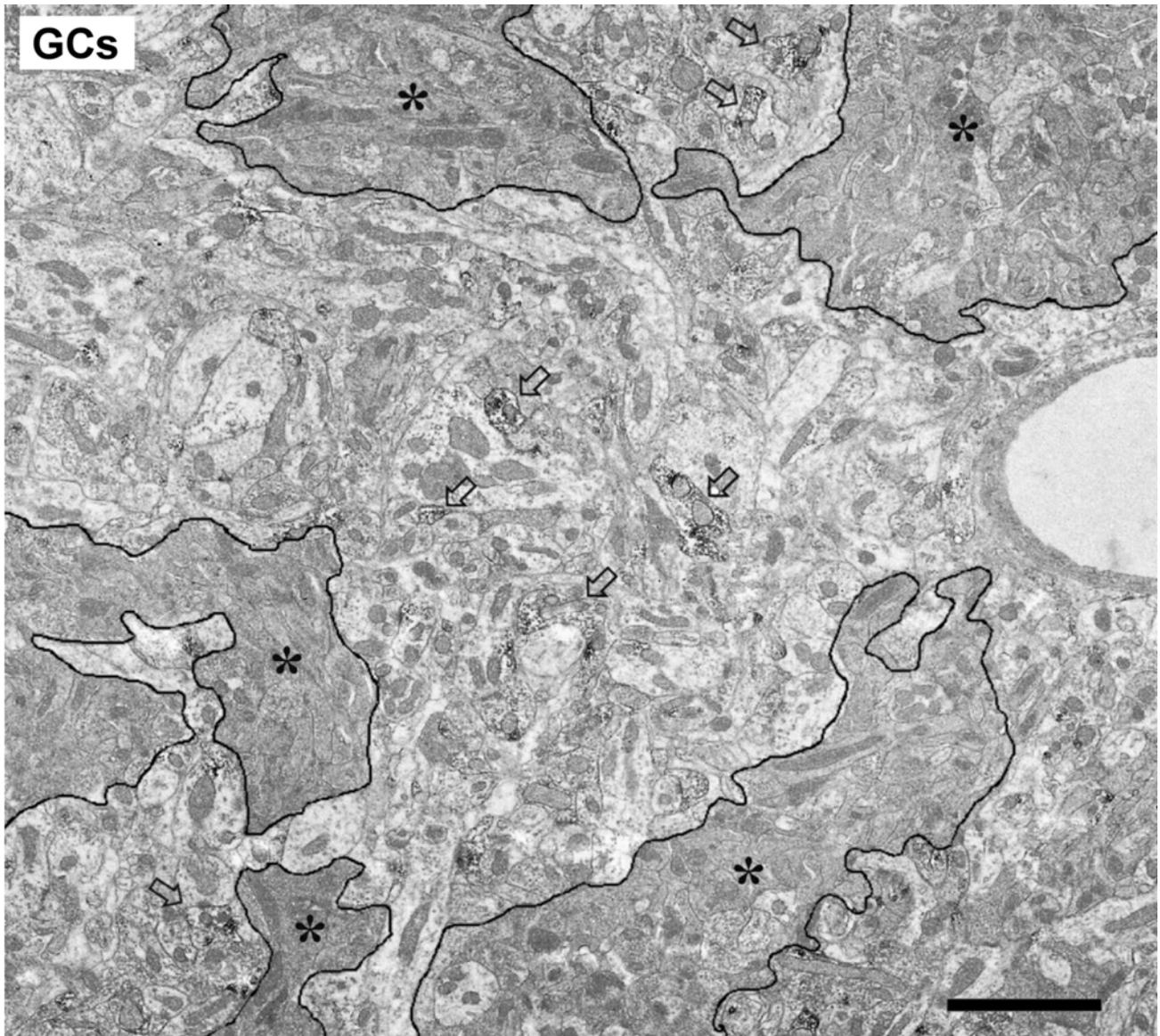


Figura 24. Relaciones sinápticas de los elementos GCs-inmunopositivos dentro del neuropilo glomerular.

(A): Los elementos GCs-inmunorreactivos establecen relaciones sinápticas con las dendritas de las células principales (M/E) en el compartimento sináptico del neuropilo glomerular. Las líneas discontinuas marcan el límite entre el compartimento sináptico y el sensorial, donde se encuentran los terminales axónicos del nervio olfatorio (NO). Puede observarse cómo una dendrita de una célula periglomerular GCs-inmunopositiva (GCs) realiza un contacto sináptico simétrico (flecha) sobre el perfil de una célula principal (M/E). Otro perfil inmunopositivo distinto recibe un contacto sináptico asimétrico (flecha abierta) desde otra célula principal.

(B): Un perfil inmunonegativo de una célula principal (M/E) realiza un contacto dendrodendrítico asimétrico (flecha abierta) sobre una dendrita de una célula periglomerular inmunopositiva a GCs.

(C): Sinapsis recíproca donde se observa un contacto sináptico simétrico (flecha) desde un perfil de una célula periglomerular inmunopositivo para GCs hacia la dendrita de una célula principal (M/E) y un contacto sináptico asimétrico (flecha abierta) desde esa misma célula principal hacia el elemento inmunopositivo.

(D): Perfil inmunopositivo para GCs que realiza un contacto sináptico simétrico (flecha) sobre el perfil de una posible célula periglomerular.

Barras de escala: (A) 400 nm; (B,C,D) 250 nm.

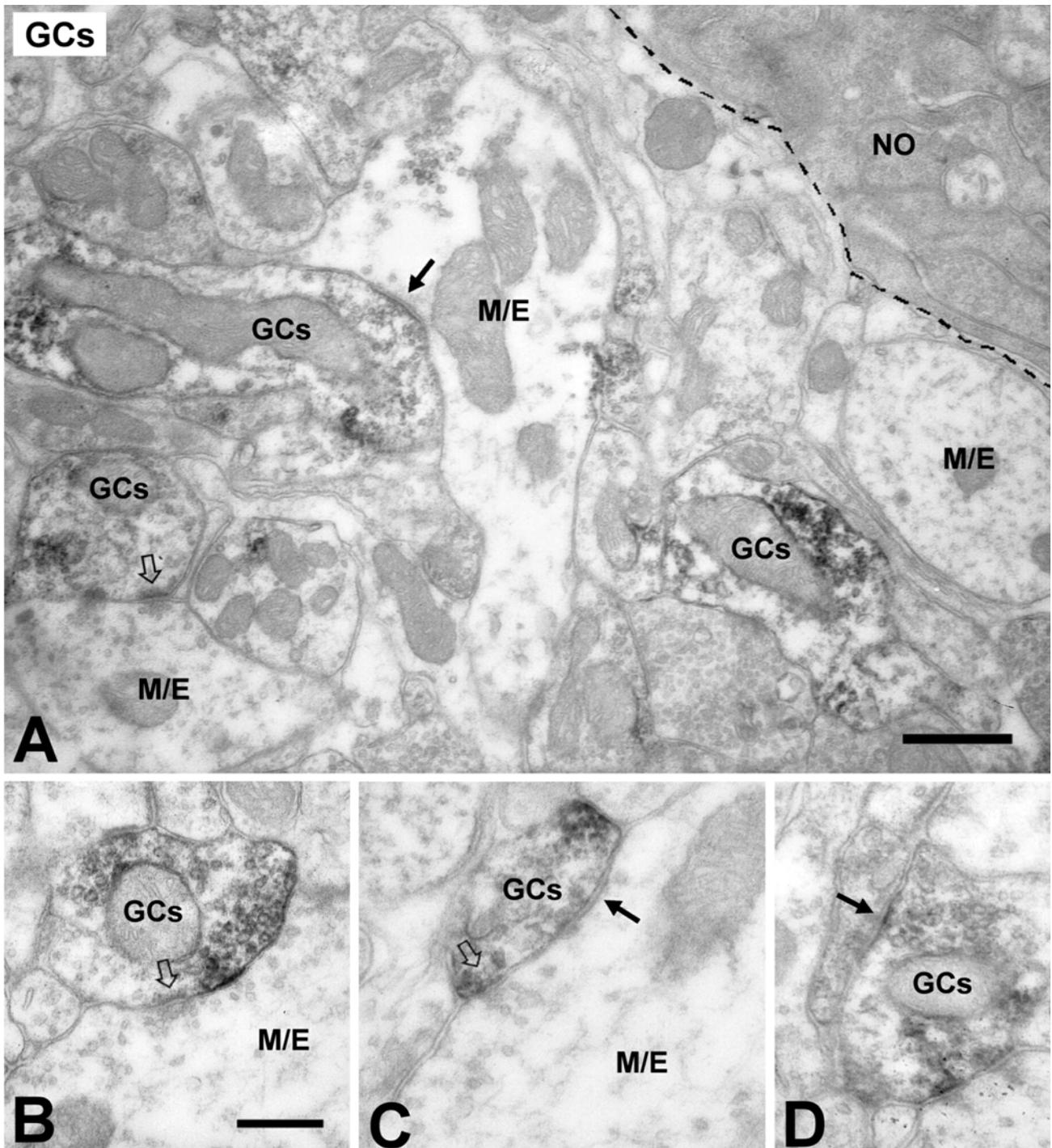


Figura 25. **Caracterización neuroquímica de las células periglomerulares que contienen GCs.**

La caracterización neuroquímica de las células periglomerulares GCs-inmunorreactivas, se realizó mediante dobles marcajes inmunofluorescentes para GCs (marcador rojo, Cy3) y GABA/TH/CCK/nNOS/CR/CB (marcador verde, Cy2) que se analizaron en el microscopio confocal. Las células periglomerulares que contienen GCs no contienen GABA (A), TH (B), CCK (C), nNOS (D) ni CR (E). Por el contrario, la mayoría de células periglomerulares que contienen GCs contienen CB (F), aunque existen unas pocas células donde no colocalizan ambos marcadores (flechas abiertas).

Barras de escala: 25 μ m.

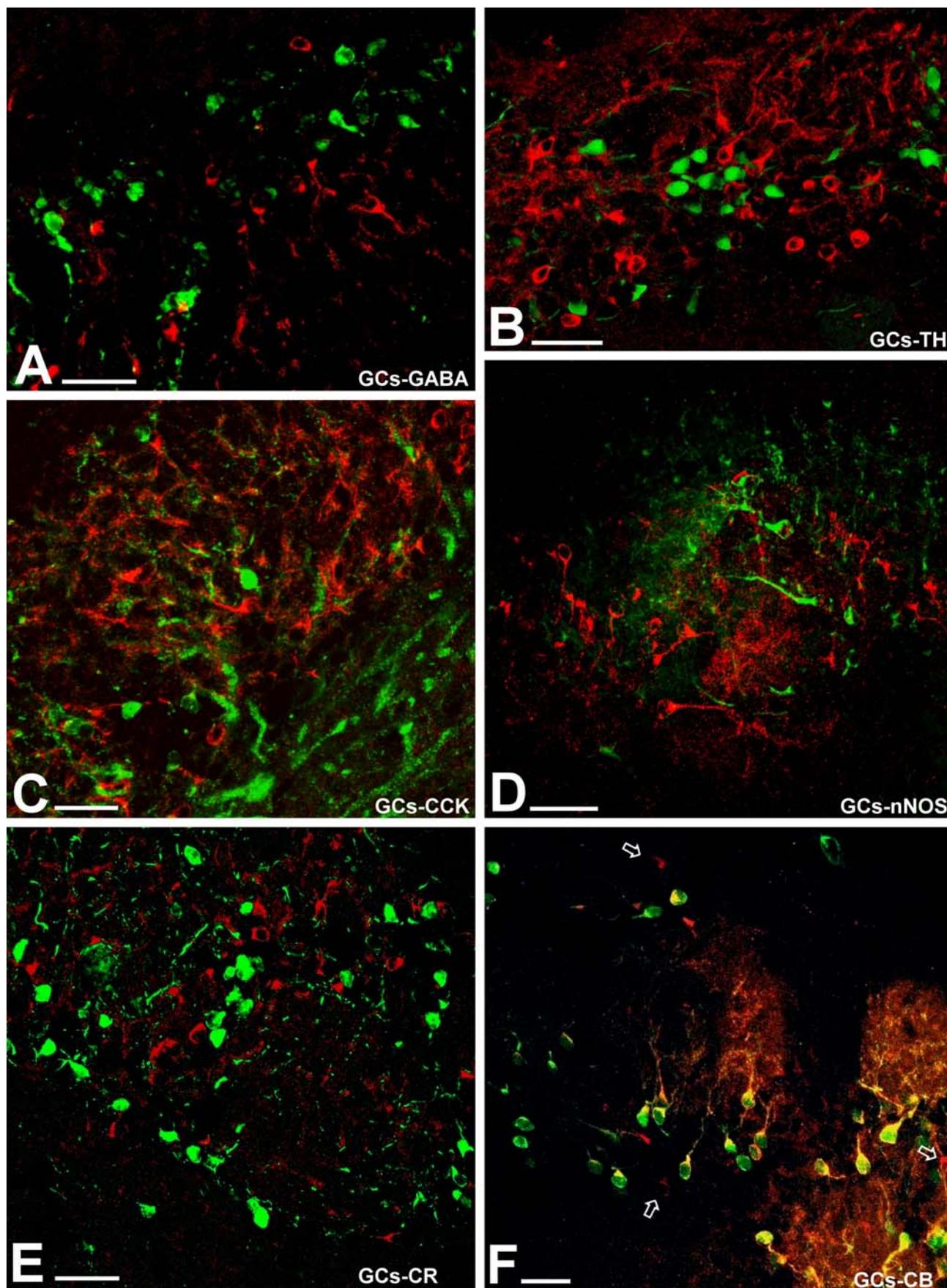


Figura 26. **Distribución de GCs en las capas inframitrales.**

(A) y (B): Los somas de las células mitrales (asteriscos) aparecen negativos para GCs.

(C) y (D): Células profundas de axón corto con la morfología típica de las células horizontales inmunopositivas en la región perimitral.

(E): Célula vertical de Cajal inmunopositiva.

(F): En la capa de las células granulares (CGR) también presentan inmunorreactividad otras células profundas de axón corto (flechas abiertas), de mayor tamaño que las células horizontales o las verticales de Cajal (flecha).

CPE: capa plexiforme externa; CM: capa de las células mitrales; CPI: capa plexiforme interna.
Barras de escala: (A,B,F) 20 μm ; (C,D) 15 μm ; (E) 10 μm .

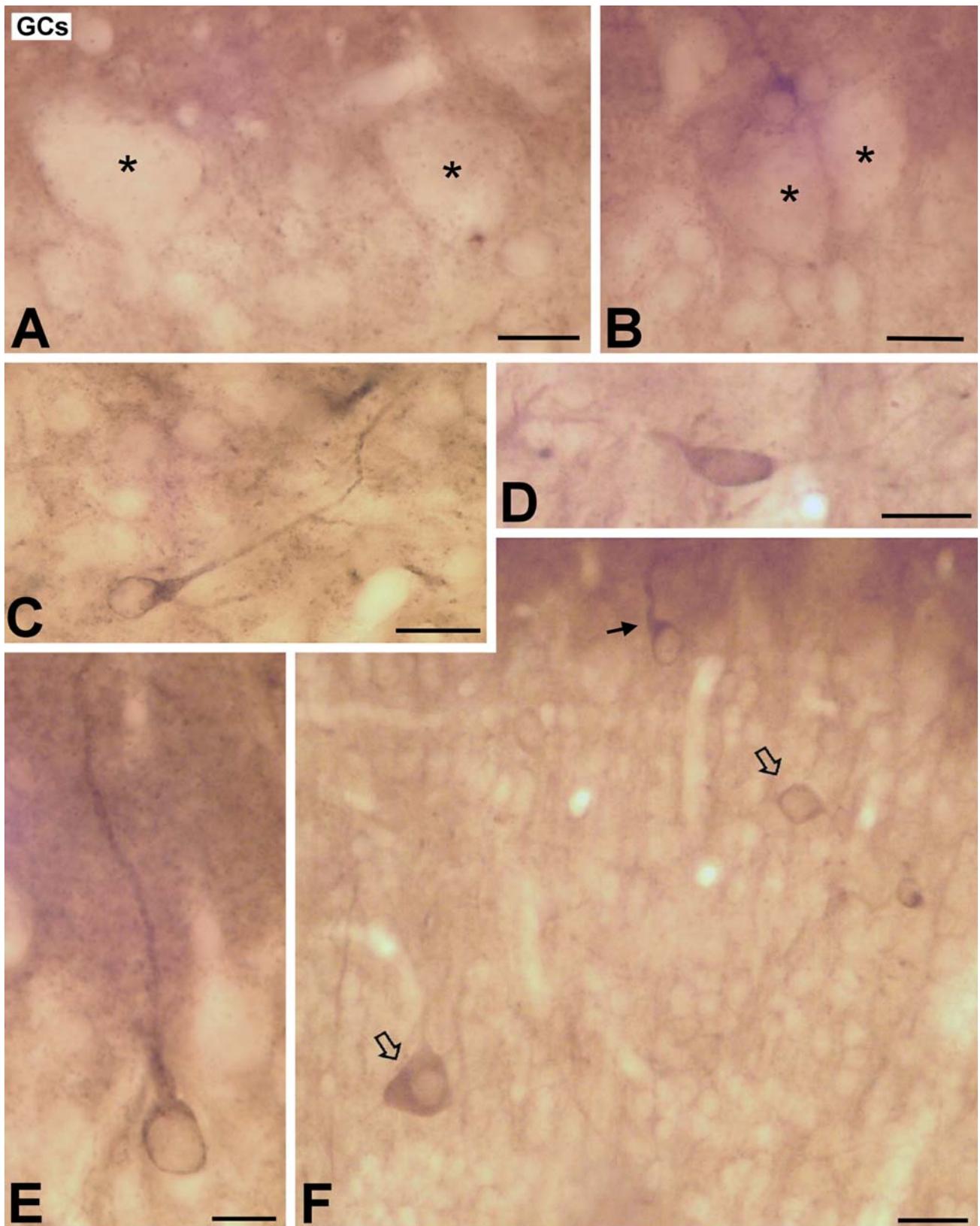


Figura 27. Caracterización neuroquímica de las células que presentan GCs fuera de la capa de los glomérulos olfatorios.

La caracterización neuroquímica de las células que expresan GCs fuera de los glomérulos olfatorios, se realizó mediante dobles marcajes inmunofluorescentes para GCs (marcador rojo, Cy3) y CB/nNOS/PV/CCK/CR (marcador verde, Cy2) que se analizaron con el microscopio confocal.

(A): En la capa plexiforme externa, las células periglomerulares desplazadas que contienen GCs también expresan CB.

(B) y (C): En la región perimitral encontramos células verticales de Cajal (B) y células horizontales inmunopositivas para GCs que también expresan CB.

(D): En la capa de las células granulares algunas células profundas de axón corto inmunopositivas para GCs expresan nNOS (flechas abiertas). Observe la presencia también de una célula marcada para GCs que es inmunonegativa para nNOS (flecha).

(E): Células profundas de axón corto inmunopositivas para GCs (flechas). En una de estas células, además, GCs colocaliza con PV (flecha abierta).

(F): GCs y CR no colocalizan en ninguna célula de la capa de los granos.

(G): Célula profunda de axón corto inmunopositiva para GCs (flecha) que no expresa CB en la parte más profunda de la capa de los granos.

(H): No se ha observado colocalización de GCs con CCK.

Barras de escala: (A) 10 μm ; (B-H) 15 μm .

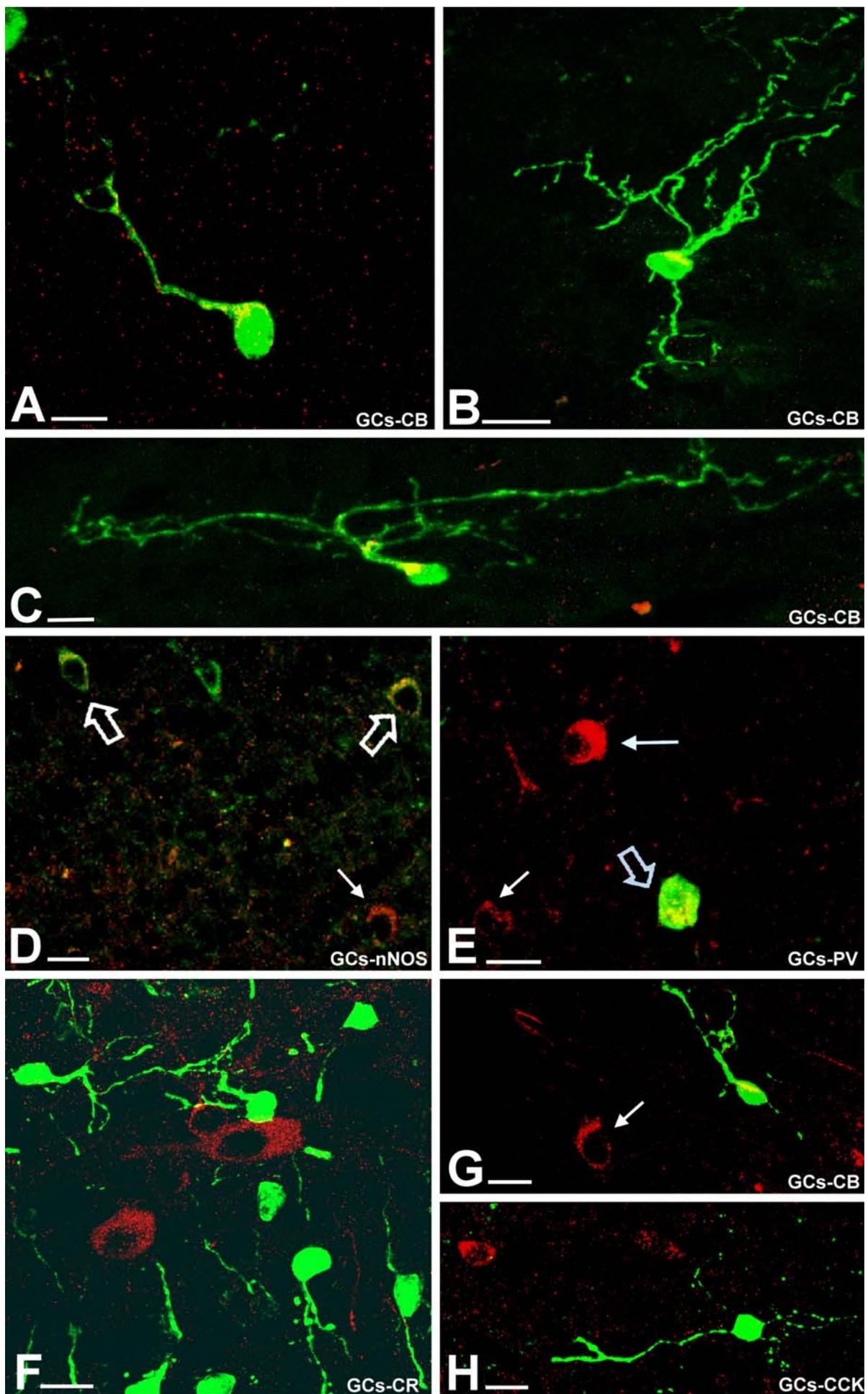


Figura 28. Células que contienen GCs en la corriente migratoria rostral.

(A) Esquema de un corte sagital del cerebro de la rata. La línea punteada muestra el nivel al que ha sido obtenida la sección coronal mostrada en (B).

(B): Vista semipanorámica del bulbo olfatorio principal en una sección coronal donde se observa la porción más rostral de la corriente migratoria rostral (flechas) en la capa de la sustancia blanca.

(C): Mayor detalle de la corriente migratoria rostral en la capa de la sustancia blanca (CSB).

(D) y (E): Detalles de las células de la corriente migratoria rostral inmunopositivas para GCs donde se observa su morfología redondeada u ovoide. Nótese que estas células se encuentran agrupadas y frecuentemente se localizan adyacentes a vasos sanguíneos (asteriscos).

(F): Esquema de un corte sagital del cerebro de la rata. El área enmarcada representa el nivel al que están tomadas las fotografías mostradas en (G), (H), (I) y (J).

(G): Vista panorámica de la corriente migratoria rostral (flechas) en un corte parasagital. El área enmarcada es la que se muestra en (H), (I) y (J).

(H): Mayor detalle de esa zona. Obsérvese como las células inmunopositivas se encuentran ordenadas formando cadenas.

(I) y (J): Detalle de las cadenas. Las células positivas muestran la misma morfología que los neuroblastos migrantes o células de tipo A. Obsérvese cómo éstas células frecuentemente se encuentran asociadas a vasos sanguíneos (asterisco).

VL: ventrículo lateral; ZSV: zona subventricular; CMR: corriente migratoria rostral; BO: bulbo olfatorio principal; CGR: capa de las células granulares; CSB: capa de la sustancia blanca. Barras de escala: (B,G) 250 μm ; (C,H) 100 μm ; (D) 20 μm ; (E,I,J) 10 μm .

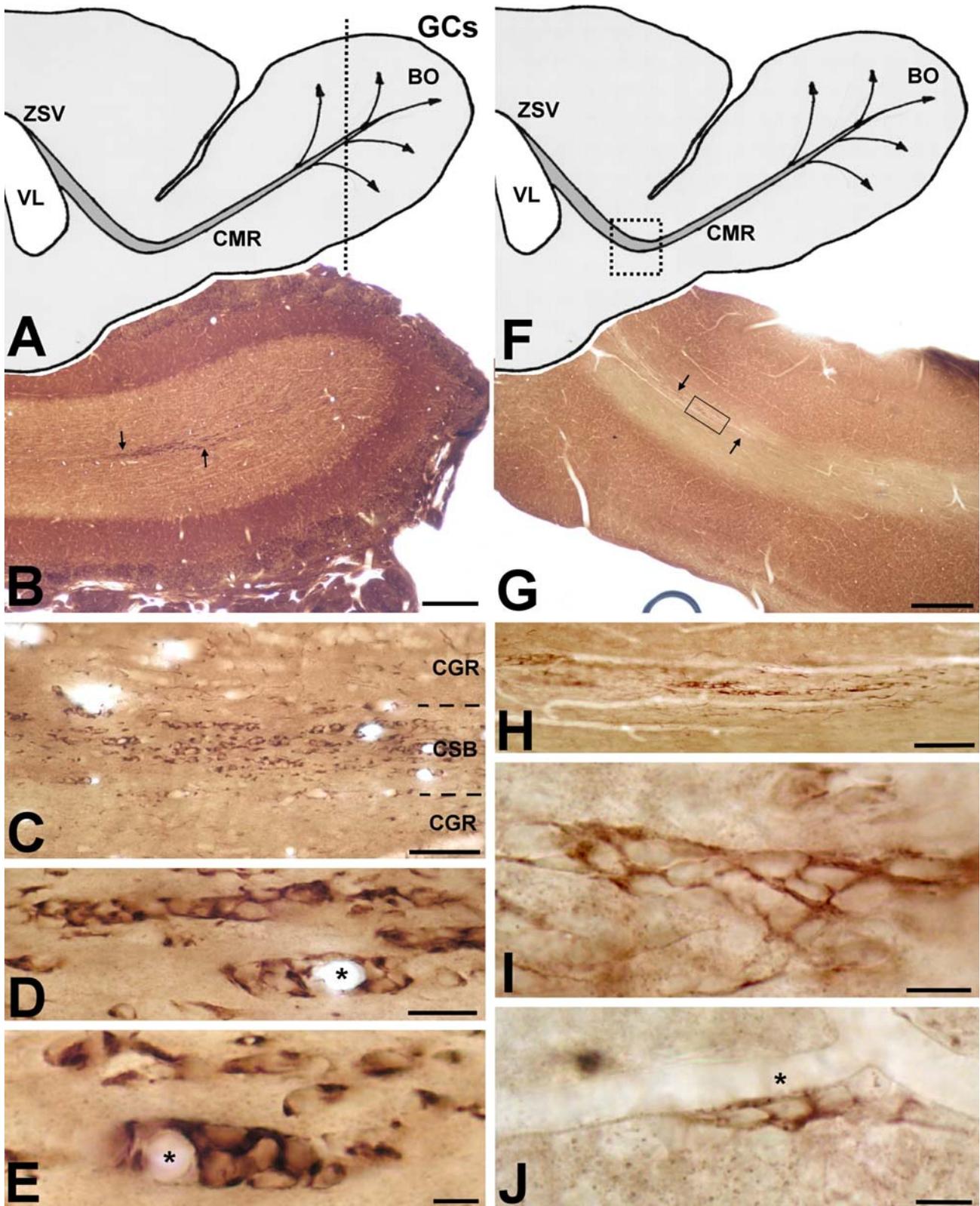


Figura 29. Análisis a microscopía electrónica de las células que contienen GCs en la corriente migratoria rostral.

(A) y (B): La ultraestructura de las células GCs-inmunorreactivas coincide con la de las células de tipo A de la corriente migratoria rostral. Nótese los espacios intercelulares existentes entre los elementos inmunopositivos.

(C) y (D): Las células de tipo B, fácilmente identificables a microscopía electrónica, son inmunonegativas.

(E): Vista semipanorámica de la porción más rostral de la corriente migratoria rostral. Las células de tipo A son inmunopositivas; por el contrario, las células de tipo C y las células de tipo E, fácilmente identificables mediante criterios ultraestructurales, son inmunonegativas.

A: células de tipo A; B: células de tipo B; C: células de tipo C; E: células de tipo E. Barras de escala: (A,B,C,E) 5 μm ; (D) 3 μm .

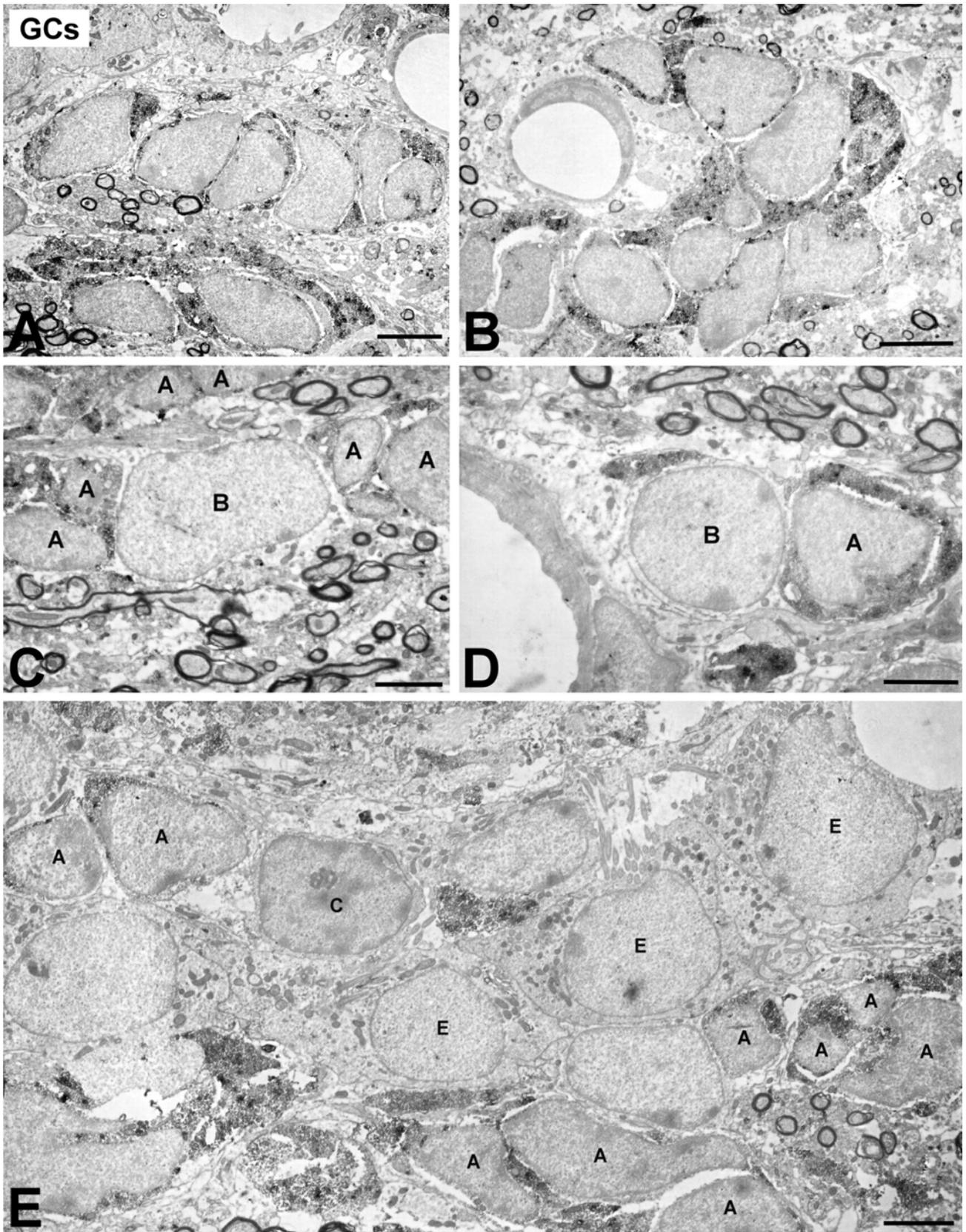


Figura 30. Caracterización neuroquímica de las células que contienen GCs en la corriente migratoria rostral.

La caracterización neuroquímica de las células que contienen GCs se realizó mediante dobles marcajes inmunofluorescentes para GCs (marcador rojo, Cy3) y DCX/GFAP/BrdU (marcador verde, Cy2) que se analizaron en el microscopio confocal.

(A): Las células que contienen GCs en la corriente migratoria rostral también contienen DCX. Obsérvese la presencia de un pericito GCs-inmunorreactivo pero que no contiene DCX (flecha abierta).

(B) y (C): Las células GCs-inmunorreactivas no contienen GFAP ni BrdU.

Barras de escala: (A,B) 25 μm ; (C) 50 μm .

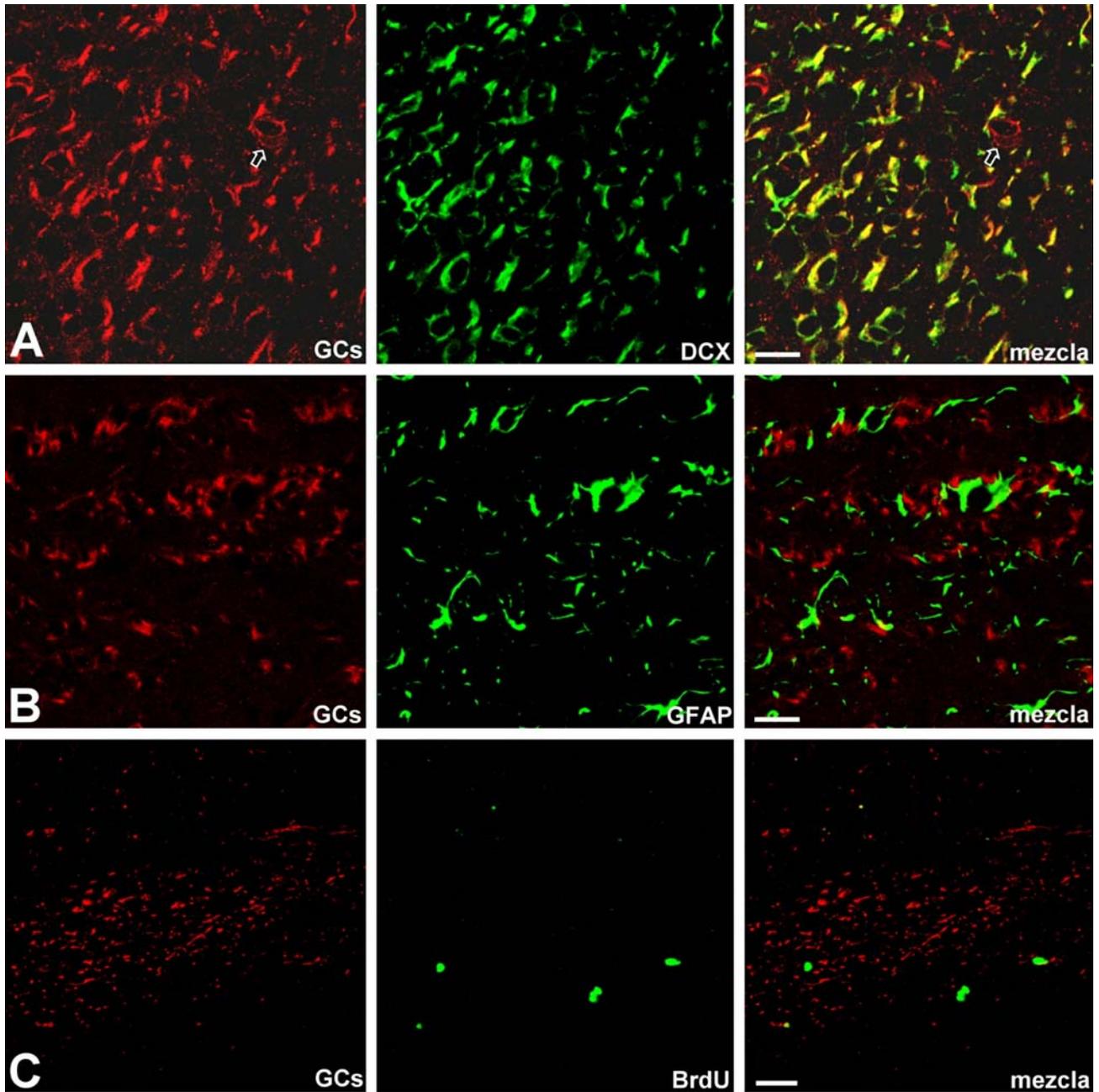


Figura 31. Distribución de CNGA2 en el bulbo olfatorio principal y en la corriente migratoria rostral.

(A): En una vista semipanorámica del bulbo olfatorio principal se observa una distribución homogénea de las células CNGA2-inmunopositivas. El tipo celular más abundante y con mayor inmunorreactividad presenta la típica morfología estrellada de los astrocitos (flechas). En la capa de los glomérulos olfatorios (CGL), en la capa plexiforme externa (CPE) y en la capa de las células mitrales (CM), además, aparecen células principales inmunopositivas (flechas abiertas), aunque el patrón de intensidad del marcaje es menor que el observado en astrocitos. Algunas células profundas de axón corto (cabezas de flecha) también presentan una débil inmunorreactividad para CNGA2.

(B) En la zona más profunda del bulbo olfatorio principal, en la capa de la sustancia blanca (CSB), también aparecen algunas células CNGA2-inmunopositivas en la corriente migratoria rostral.

(C) Su análisis a microscopía electrónica de transmisión muestra que son las células de tipo B de la corriente migratoria rostral. Las células de tipo A, identificadas por criterios ultraestructurales, no presentan inmunorreactividad.

A: células de tipo A de la corriente migratoria rostral; B: células de tipo B de la corriente migratoria rostral. Barras de escala: (B) 50 μ m; (C) 25 μ m; (D) 3nm.

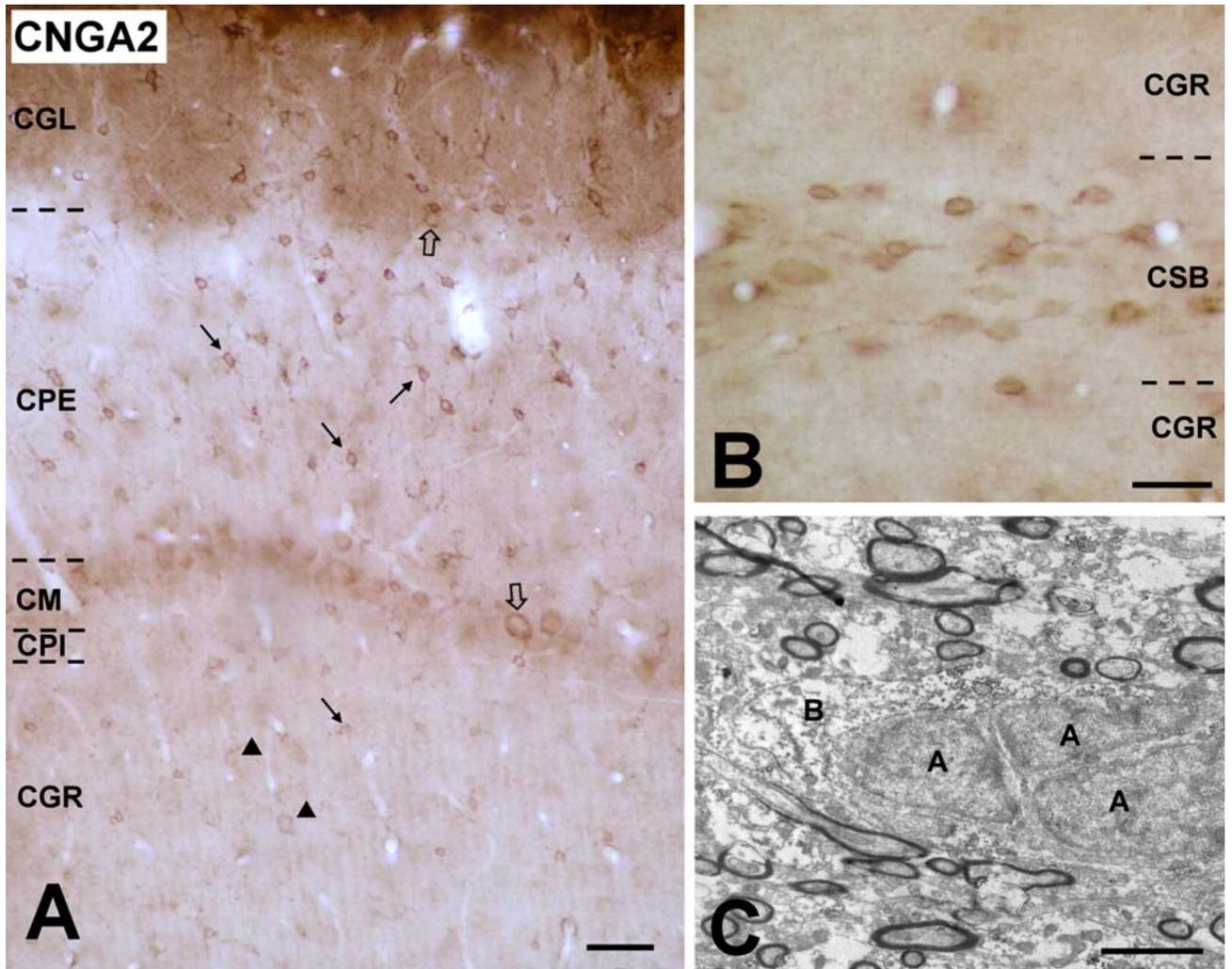


Figura 32. Caracterización neuroquímica de las células que contienen CNGA2.

La caracterización neuroquímica de las células CNGA2-inmunopositivas se realizó mediante dobles marcajes inmunofluorescentes para CNGA2 (marcador rojo, Cy3) y GFAP/TH/nNOS/CCK/CR/CB/PV (marcador verde, Cy2) que se analizaron en el microscopio confocal.

(A), (B), (C) y (D): La mayoría de células que contienen CNGA2 presentan GFAP. Sin embargo, algunas células positivas para CNGA2 son GFAP-inmunonegativas (flechas abiertas) tanto en los glomérulos olfatorios (A) y (B), como en la capa plexiforme externa (C) y en la capa de las células granulares (D).

(E): En los glomérulos olfatorios no hay colocalización de CNGA2 y TH.

(F): CNGA2 y nNOS no colocalizan en los glomérulos olfatorios.

(G): Tampoco hay colocalización de CNGA2 y CCK en células periglomerulares.

(H): CNGA2 y CR no colocalizan en los glomérulos olfatorios.

(I): No existe colocalización de CNGA2 y CB en los glomérulos olfatorios.

(J): En la capa plexiforme externa no hay colocalización de CNGA2 y PV.

(K): Las células mitrales contienen CNGA2 y CR (flechas); sin embargo, ninguna célula CNGA2-inmunopositiva de la capa de las células granulares presenta CR.

(L): Las células profundas de axón corto inmunopositivas para CNGA2 también presentan nNOS.

Barras de escala: (A,D-J) 15 μ m; (B) 10 μ m; (C) 20 μ m; (K) 40 μ m; (L) 30 μ m.

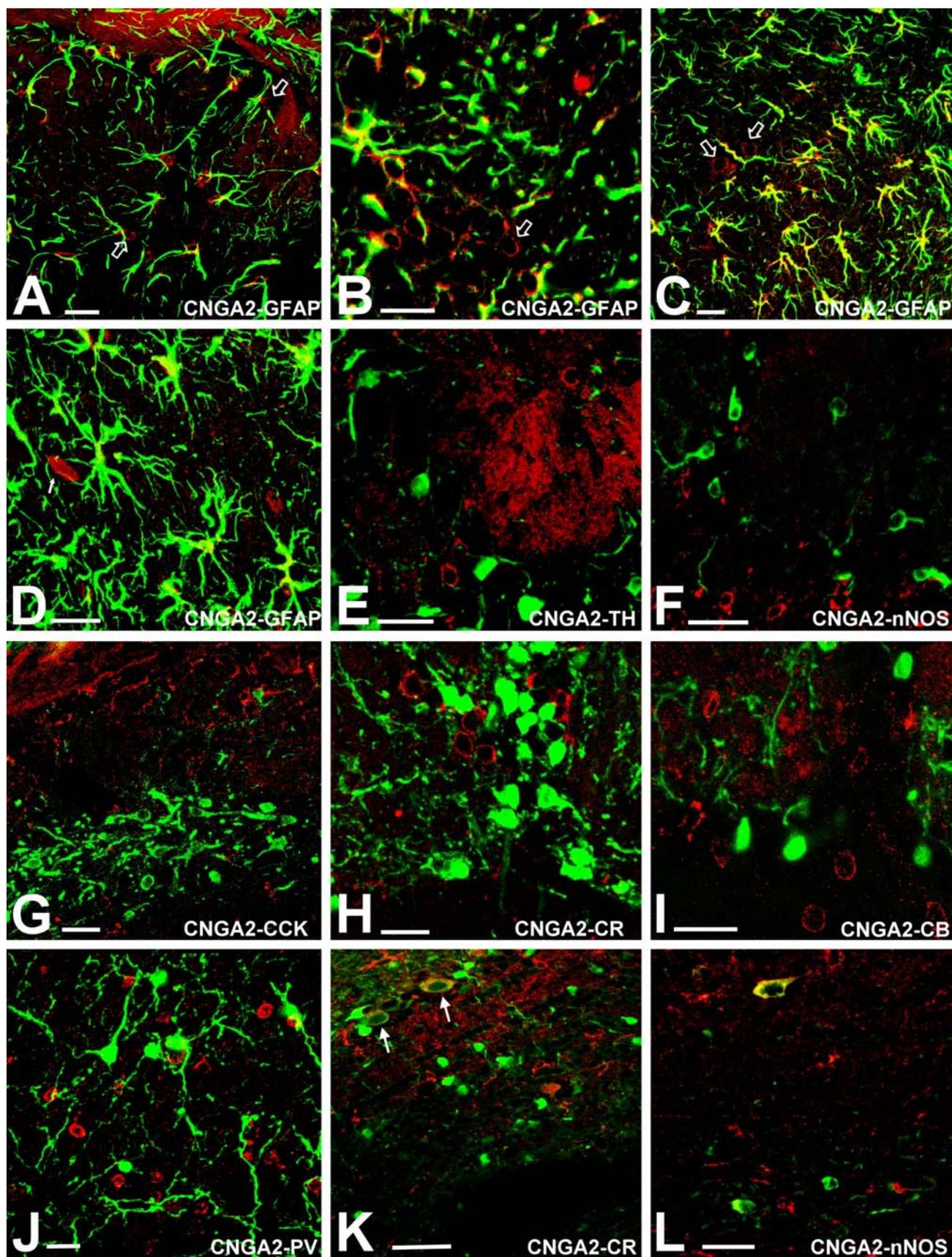


Figura 33. Distribución de CNGA3 en la retina y el bulbo olfatorio principal.

(A): La especificidad del anticuerpo utilizado en el estudio ha sido probada analizando el marcaje en el segmento externo de los conos de la retina (flechas).

(B) Vista semipanorámica del bulbo olfatorio principal teñido para CNGA3. Las capas que presentan mayor intensidad de marcaje son la capa del nervio olfatorio (CNO) y la capa plexiforme externa (CPE). A pesar de esto, todas las capas del bulbo olfatorio presentan abundantes elementos CNGA3-inmunopositivos.

CGL: capa de los glomérulos olfatorios; CM: capa de las células mitrales; CPI: capa plexiforme interna; CGR: capa de las células granulares. Barras de escala: (A) 50 μ m; (B) 200 μ m.

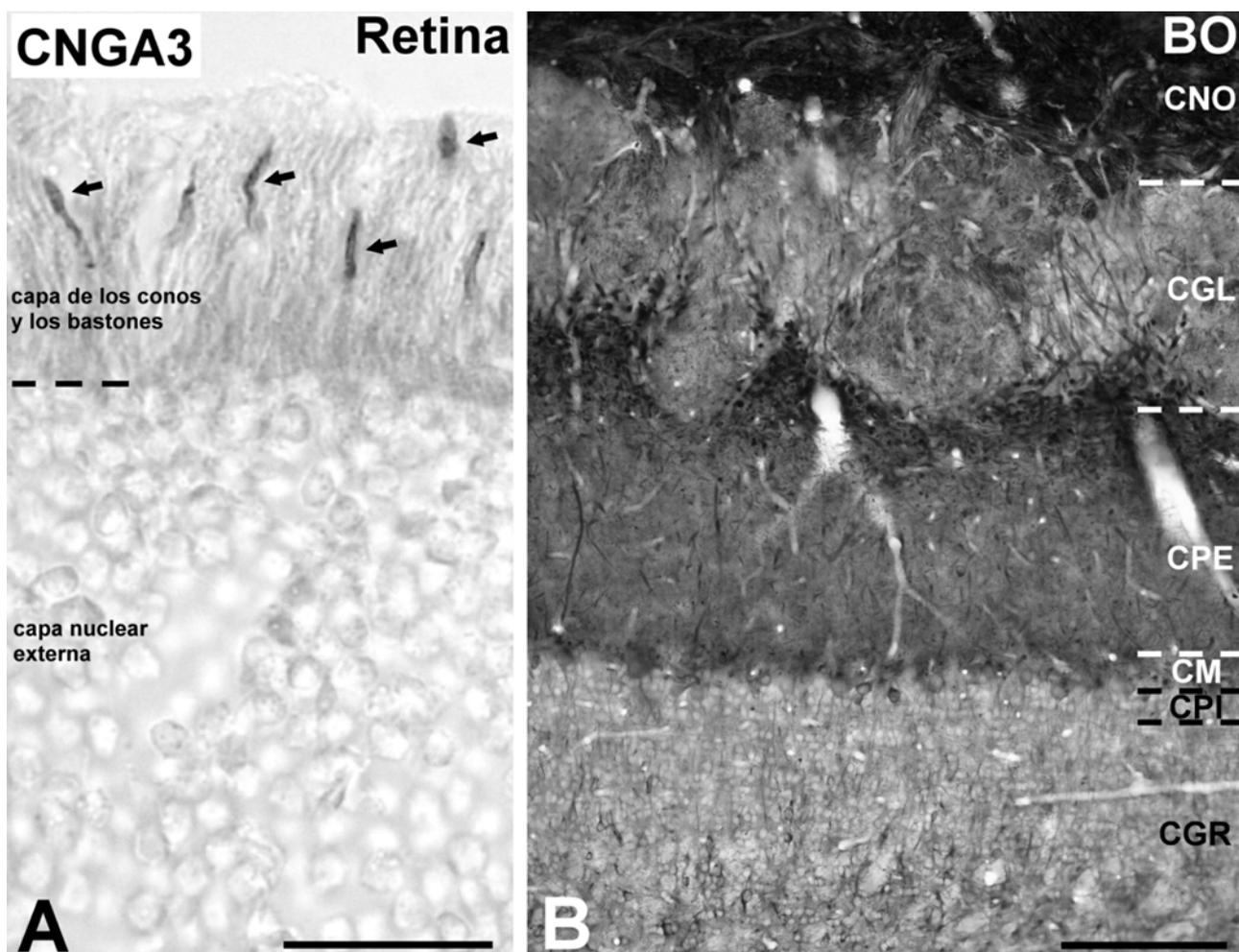


Figura 34. Marcaje para CNGA3 en la capa del nervio olfatorio.

(A): En la capa del nervio olfatorio (CNO) aparece un intenso marcaje en elementos similares a fibras que aparentemente forman haces. Nótese cómo este marcaje desaparece en el límite con la capa de los glomérulos olfatorios (CGL).

(B): Los haces de elementos inmunopositivos del nervio olfatorio (flecha abierta) no penetran en el interior del neuropilo glomerular (g).

(C) y (D): Con la microscopía electrónica de transmisión se demuestra que la marca para CNGA3 está localizada en los procesos de la glía envolvente el nervio olfatorio (flechas). Los axones del nervio olfatorio (Ax) no son inmunopositivos.

(E): En algunas ocasiones, se ve marcado el cuerpo celular (asterisco) de alguna de estas células de glía envolvente.

(F): Los procesos positivos de la glía envolvente (flechas) pueden ser perfectamente diferenciados de los haces de axones del nervio olfatorio en esta sección longitudinal.

Barras de escala: (A) 100 μ m; (B) 50 μ m; (C, D) 500nm; (E, F) 1 μ m.

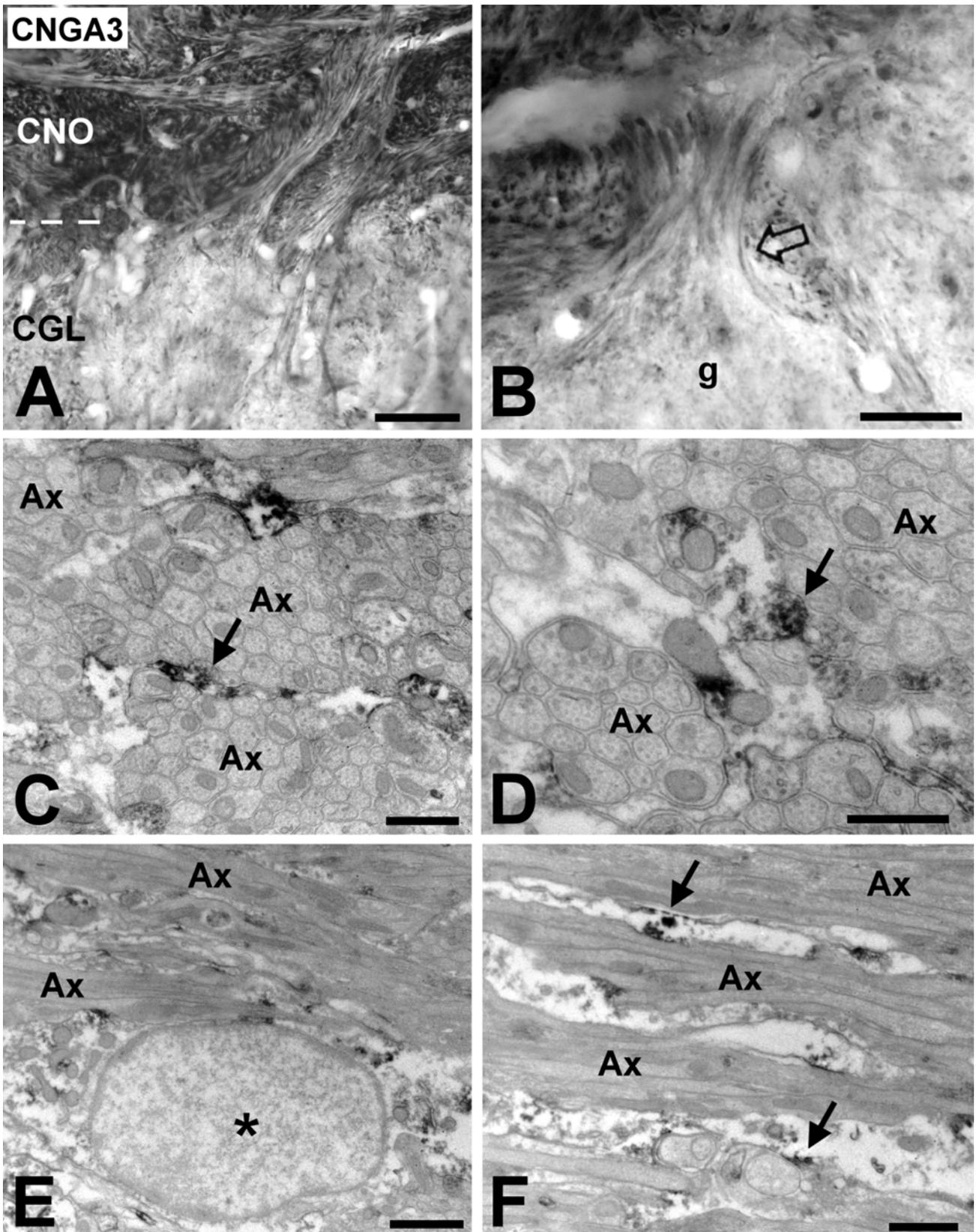


Figura 35. Distribución de CNGA3 en la capa de los glomérulos olfatorios.

(A): CNGA3 aparece en algunas neuronas (flechas) localizadas en la región periglomerular de un glomérulo olfatorio (g).

(B) Las células periglomerulares CNGA3-inmunopositivas (flechas) pueden ser identificadas entre las gruesas dendritas de las células principales que cursan por la región periglomerular de los glomérulos olfatorios.

(C) y (D): Además de células periglomerulares (flechas), también aparecen células empenachadas externas inmunopositivas (flechas abiertas) en la región periglomerular de los glomérulos olfatorios. Obsérvese que las células periglomerulares y las células empenachadas externas inmunopositivas son perfectamente distinguibles por su tamaño y por sus características morfológicas.

CGL: capa de los glomérulos olfatorios; CPE: capa plexiforme externa. Barras de escala: (A, B) 25 μ m; (C, D) 12.5 μ m.

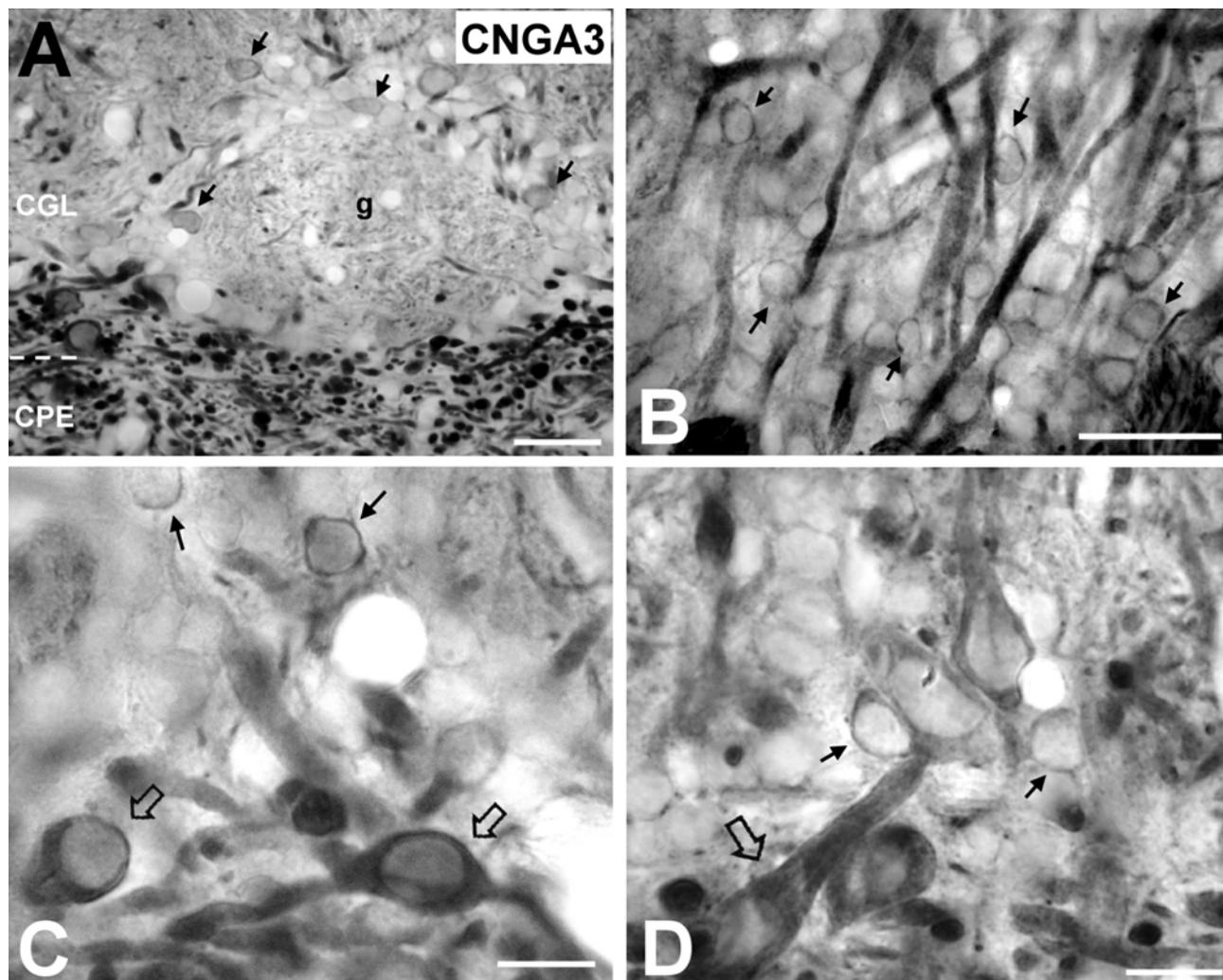


Figura 36. Análisis a microscopía electrónica de transmisión del marcaje de CNGA3 en distintos tipos celulares en el interior del neuropilo glomerular.

(A-D): Presencia de CNGA3 en células principales. (E-H) Presencia de CNGA3 en células periglomerulares.

(A) y (B): Dendritas de células principales CNGA3-inmunorreactivas (M/E) que realizan contactos sinápticos asimétricos (flechas abiertas) sobre dendritas de células periglomerulares inmunonegativas (PG).

(C): La detección de CNGA3 utilizando partículas de oro coloidal en preinclusión muestra una dendrita de una célula principal inmunopositiva (M/E) estableciendo una sinapsis (flecha abierta) sobre la dendrita de una célula periglomerular inmunonegativa (PG). Nótese que no existe una localización subcelular específica de las partículas de oro coloidal en el interior de la dendrita inmunorreactiva, encontrándose indistintamente unidas a la membrana plasmática o en el citoplasma.

(D): Doble marcaje para CNGA3 con DAB en preinclusión y para GABA con oro coloidal en postinclusión. La dendrita de una célula principal inmunorreactiva para CNGA3 (M/E) realiza un contacto sináptico asimétrico (flecha abierta) sobre la dendrita de una célula periglomerular CNGA3-inmunonegativa y GABAérgica (PG).

(E): Perfil de una dendrita de una célula periglomerular CNGA3-inmunorreactiva (PG) recibiendo contactos sinápticos asimétricos desde una dendrita de una célula principal (M/E) y desde un terminal axónico del nervio olfatorio (NO) (flechas abiertas). Obsérvese que el precipitado de DAB se encuentra unido a la membrana plasmática de la célula periglomerular (flecha).

(F): Dendrita de una célula principal inmunopositiva para CNGA3 (M/E) en material procesado con oro coloidal en preinclusión. Esta dendrita realiza un contacto sináptico asimétrico (flecha abierta) sobre la dendrita de una célula periglomerular (PG) que es también CNGA3-inmunorreactiva. Nótese como en la célula periglomerular las partículas de oro coloidal están ancladas a la membrana plasmática (flechas).

(G) y (H): Dobles marcajes para CNGA3 con DAB en preinclusión y para GABA con oro en postinclusión. Se pueden observar dos células periglomerulares (PG) doblemente marcadas en el compartimento sensorial del neuropilo glomerular. Las flechas abiertas señalan un contacto sináptico asimétrico que la célula periglomerular recibe desde el nervio olfatorio (NO) en (G) y un contacto sináptico simétrico que la célula periglomerular realiza sobre una célula principal (M/E) en (H).

Las flechas indican la marca de DAB en las células periglomerulares. Barras de escala: (A, B, D) 250nm; (C,E,F,G,H) 500nm

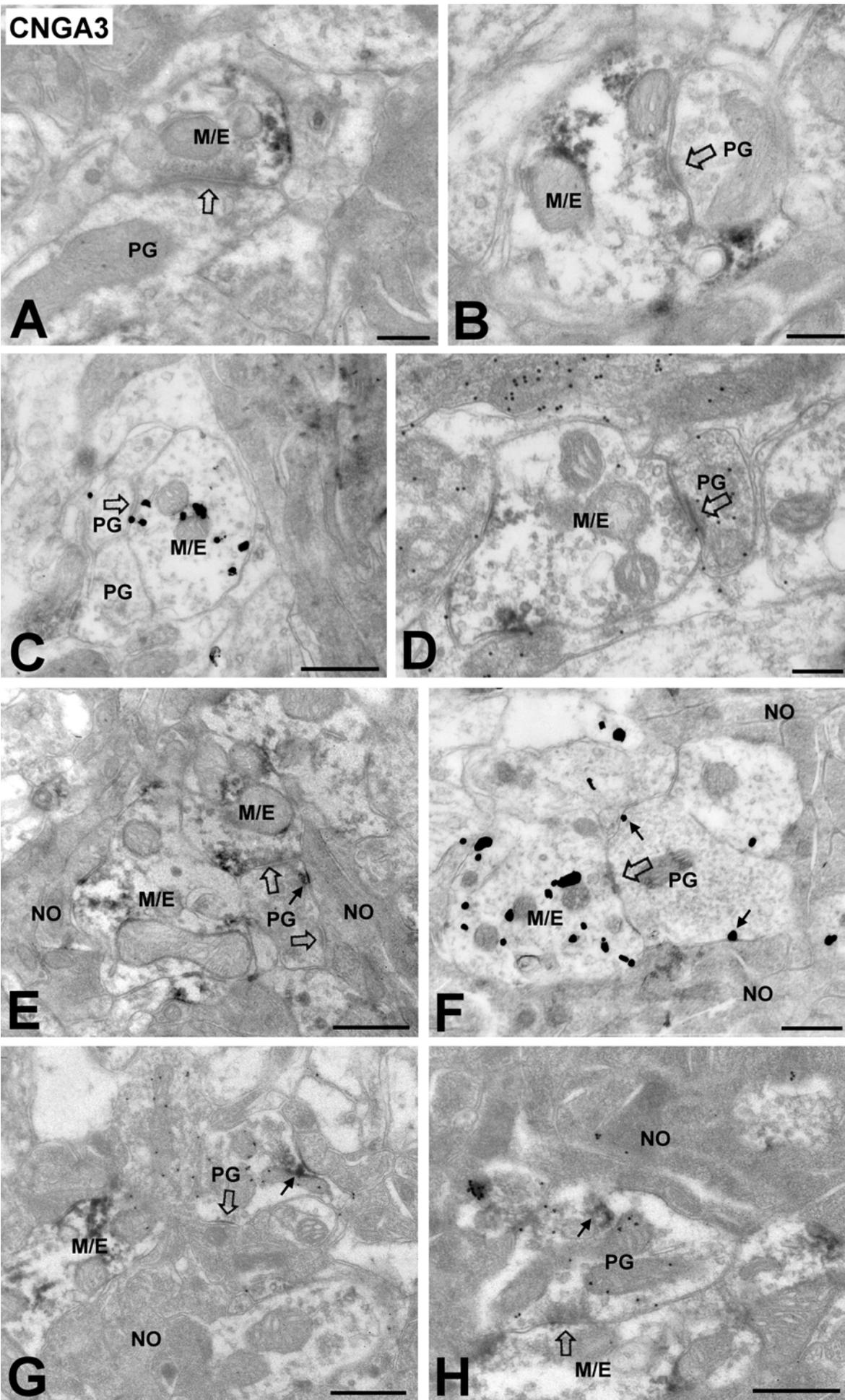


Figura 37. Caracterización neuroquímica de las células que presentan CNGA3.

La caracterización neuroquímica de las células CNGA3-inmunopositivas se realizó mediante dobles marcajes inmunofluorescentes para CNGA3 (marcador rojo, Cy3) y nNOS/TH/CCK/CB/CR/PV/DCX (marcador verde, Cy2) que se analizaron en el microscopio confocal. En la capa de los glomérulos olfatorios, las células periglomerulares inmunopositivas para CNGA3 no expresan nNOS (A), TH (B), CCK (C; flechas), CB (D) ni CR (E). En la capa plexiforme externa, las células inmunopositivas no presentan PV (F) pero sí que presentan CCK (C). En la capa de las células granulares, las células CNGA3-inmunorreactivas no presentan los marcadores típicos de células granulares como nNOS (G) o CR (H). Por el contrario, las células inmunopositivas de morfología fusiforme presentes en esta capa sí que expresan DCX (I).

Barras de escala: 50 μ m.

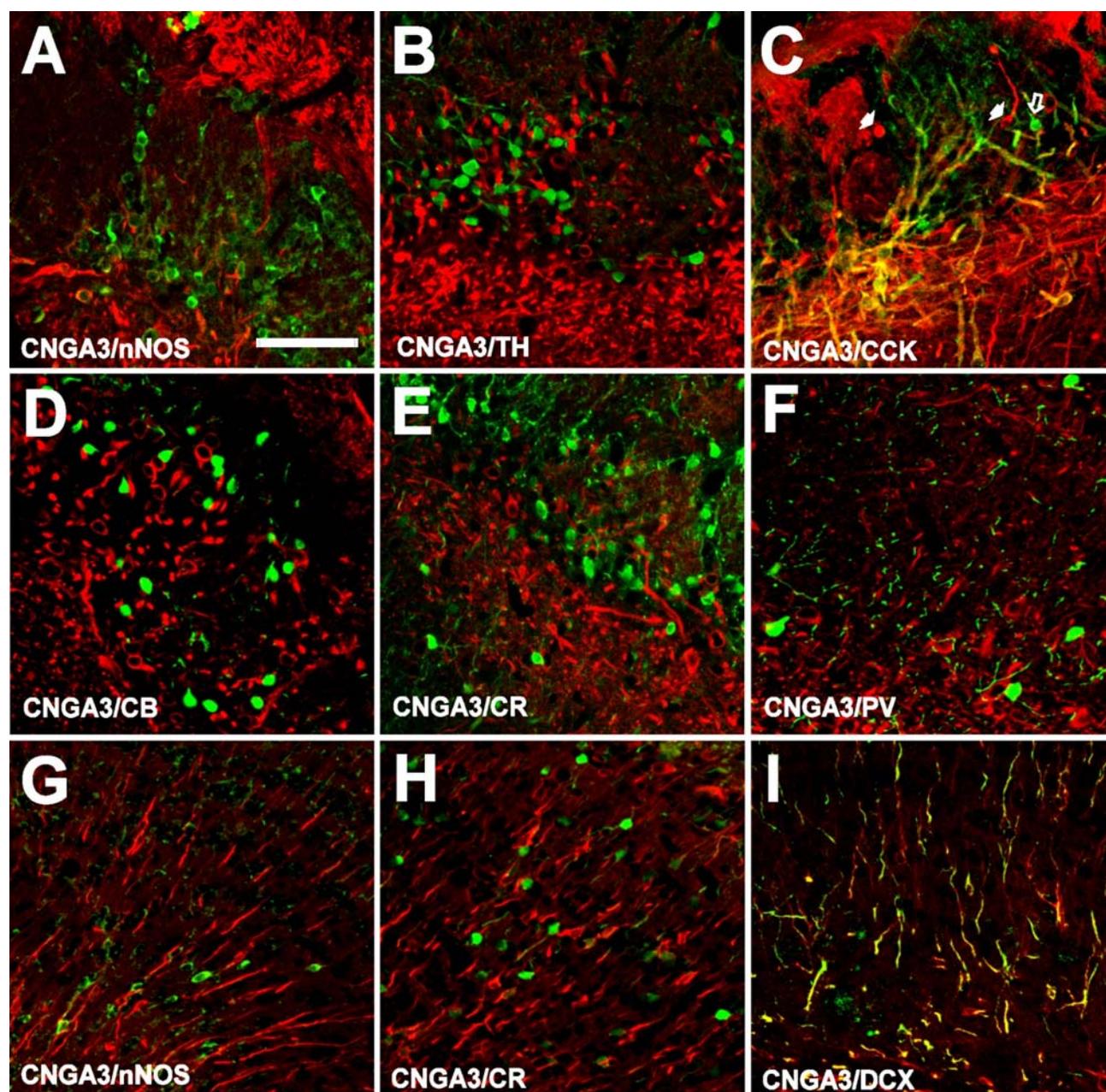


Figura 38. Distribución de CNGA3 en la capa plexiforme externa y en la capa de las células mitrales.

(A): Vista semipanorámica de la capa plexiforme externa donde el marcaje para CNGA3 es intenso, debido principalmente a la inmunorreactividad que presentan las dendritas de las células principales. La densidad de elementos positivos es mayor en la porción más externa de la capa (CPE ex), si se compara con la porción más interna (CPE in). La dendrita apical de una célula mitral puede observarse atravesando perpendicularmente la capa (flechas).

(B): Células empenachadas externas inmunopositivas localizadas en la porción externa de la capa plexiforme externa.

(C): Célula empenachada media localizada en la porción interna de la capa plexiforme externa.

(D): Las células mitrales también presentan inmunorreactividad para CNGA3. Obsérvese cómo la porción inicial de los axones (flechas) mantienen el marcaje cuando penetran en la capa plexiforme interna.

Barras de escala: (A) 100 μ m; (B-D) 25 μ m.

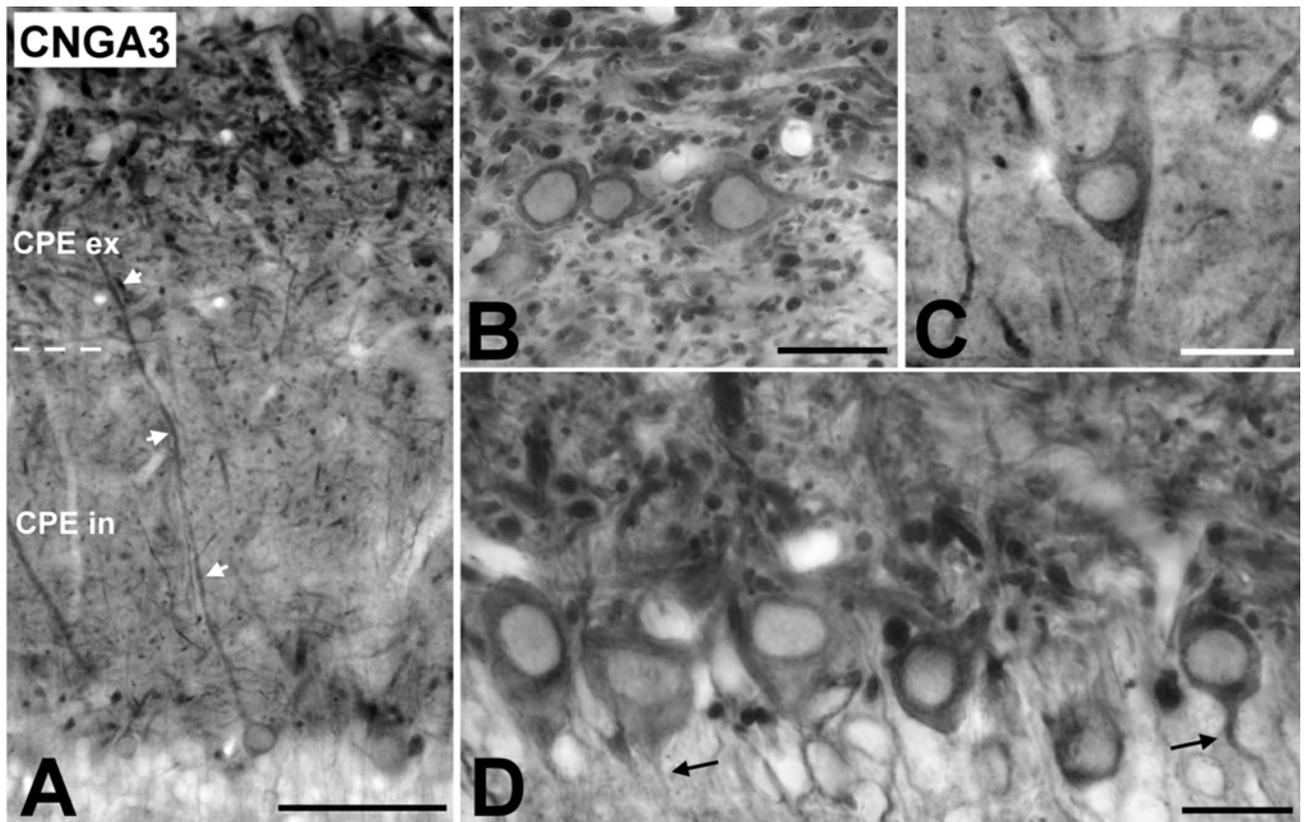


Figura 39. Análisis a microscopía electrónica de transmisión del marcaje de CNGA3 en el neuropilo de la capa plexiforme externa.

(A): La detección de CNGA3 se ha realizado en preinclusión utilizando partículas de oro coloidal. Se han encontrado partículas de oro en las dendritas de las células principales (M/E). Las gémulas de las células granulares (Gr), que establecen relaciones sinápticas (flechas abiertas) con las dendritas de las células principales, son inmunonegativas.

(B) y (C): Dobles marcajes para CNGA3 con DAB en preinclusión y para GABA con oro coloidal en postinclusión. En (B), dos gémulas de células granulares (Gr) GABAérgicas e inmunonegativas para CNGA3 reciben contactos sinápticos asimétricos (flechas abiertas) desde la dendrita de una célula principal (M/E) CNGA3-inmunorreactiva. En (C), un perfil de una interneurona GABAérgica de la capa plexiforme externa (In) inmunonegativa para CNGA3 recibe un contacto sináptico asimétrico (flecha abierta) desde una dendrita de una célula principal inmunorreactiva para CNGA3 (M/E).

Barras de escala: 500nm.

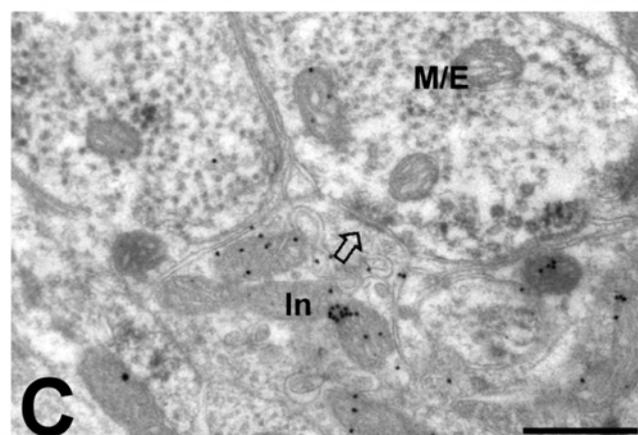
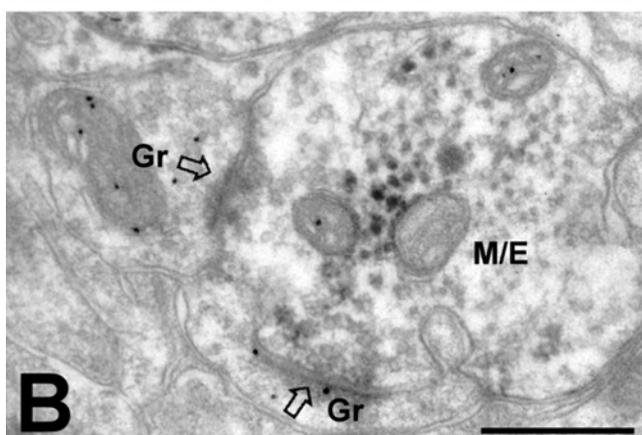
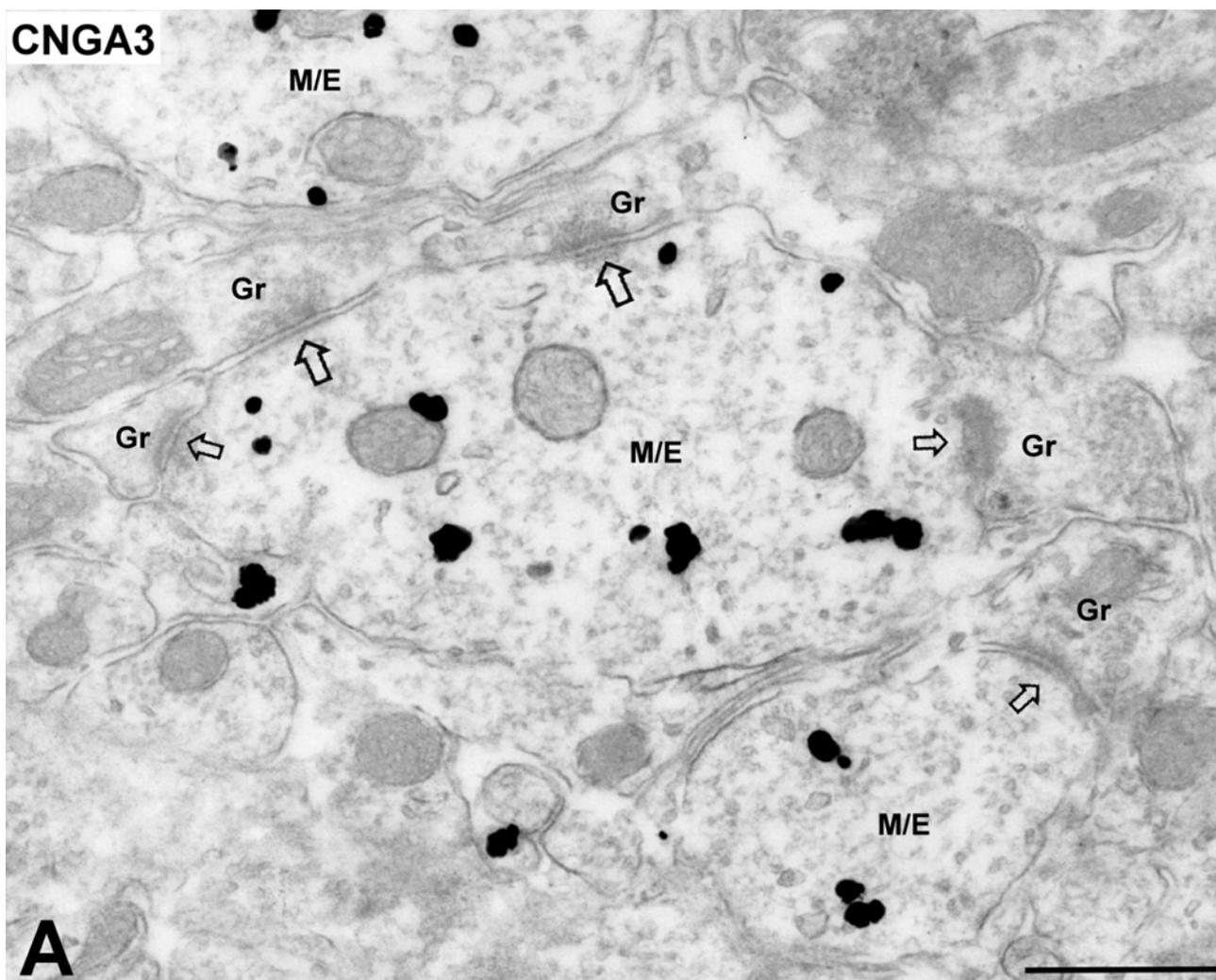


Figura 40. Distribución de CNGA3 en las capas inframitrales.

(A): En una vista semipanorámica, se observa una elevada densidad de células inmunorreactivas para CNGA3 en las capas inframitrales.

(B): Células profundas de axón corto inmunopositivas (flechas) de la capa plexiforme interna. Obsérvese cómo son de menor tamaño que las células mitrales (flecha abierta) y fácilmente distinguibles de ellas por la morfología.

(C): Tres células profundas de axón corto inmunopositivas para CNGA3 (flechas abiertas) se sitúan en la parte superior de la capa de las células granulares. Estas células son fácilmente distinguibles de las células fusiforme inmunopositivas (flecha) localizadas en la misma región.

(D), (E) y (F): Vistas en detalle de células profundas de axón corto de morfología piriforme o poligonal inmunopositivas para CNGA3 y situadas a distintos niveles de la región inframitral.

CPE: capa plexiforme externa; CM: capa de las células mitrales; CPI: capa plexiforme interna; CGR: capa de las células granulares. Barras de escala: (A) 50 μ m; (B, C) 25 μ m; (D-F) 12.5 μ m.

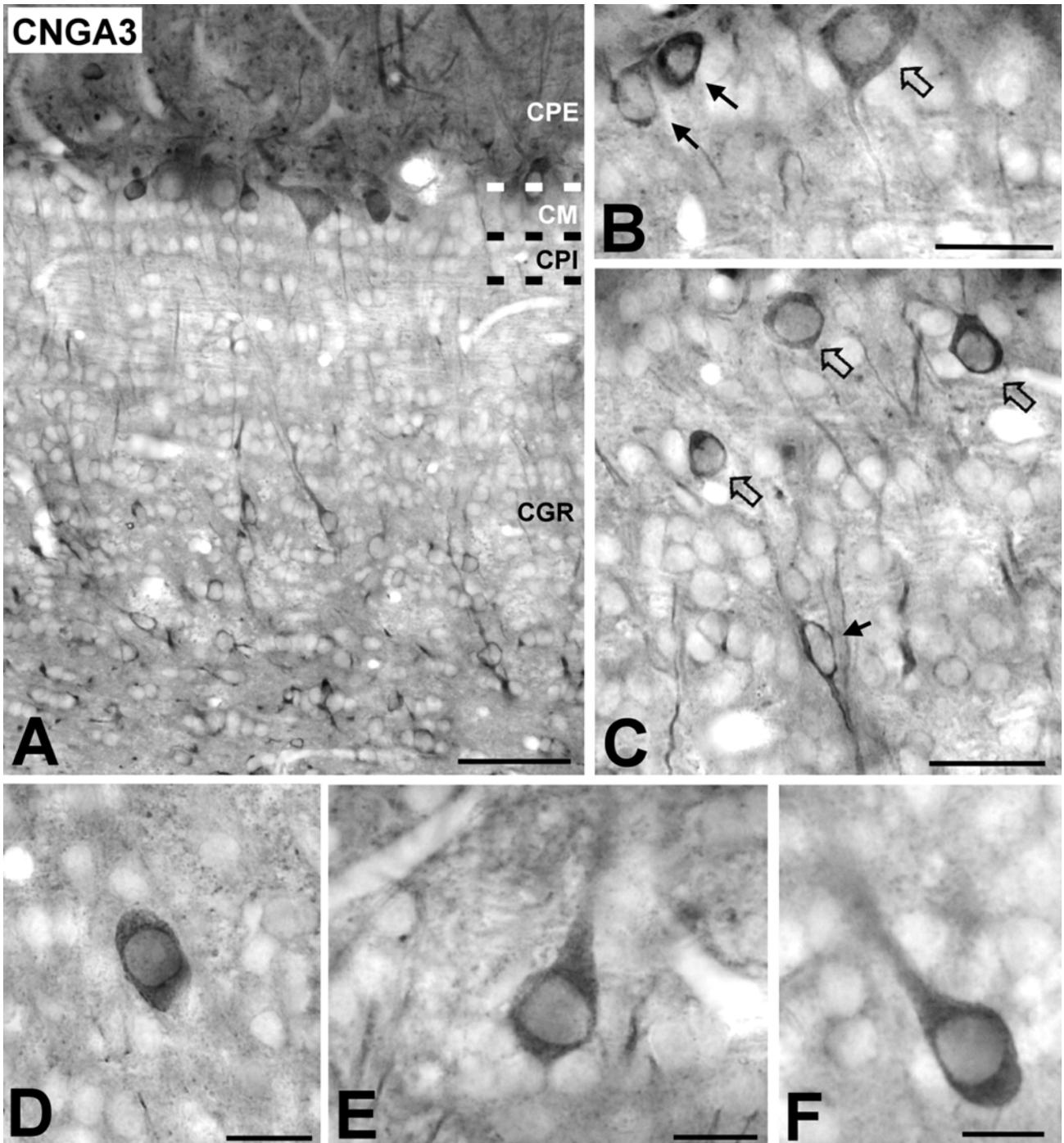


Figura 41. CNGA3 en las células fusiformes de las capas inframitrales.

(A): En una vista semipanorámica de la región inframitral, se muestran células con morfología fusiforme inmunorreactivas para CNGA3. La densidad de estas células es mayor en la porción más profunda de la capa de las células granulares (CGR) y en la capa de la sustancia blanca (CSB). Nótese que la corriente migratoria rostral (CMR) también contiene una abundante población de células inmunopositivas.

(B): Las células fusiformes inmunorreactivas para CNGA3 (flechas) son morfológicamente distintas de las células profundas de axón corto positivas (flecha abierta) que se encuentran en la misma región.

(C) y (D): En estas células fusiformes se observan uno o dos procesos radiales orientados perpendicularmente a la laminación del bulbo olfatorio principal. (E) y (F): Los procesos presentes en estas células no están muy ramificados; sólo ocasionalmente puede verse alguna pequeña ramificación emergiendo de ellos (flechas).

Barras de escala: (A) 100 μ m; (B-F) 12.5 μ m.

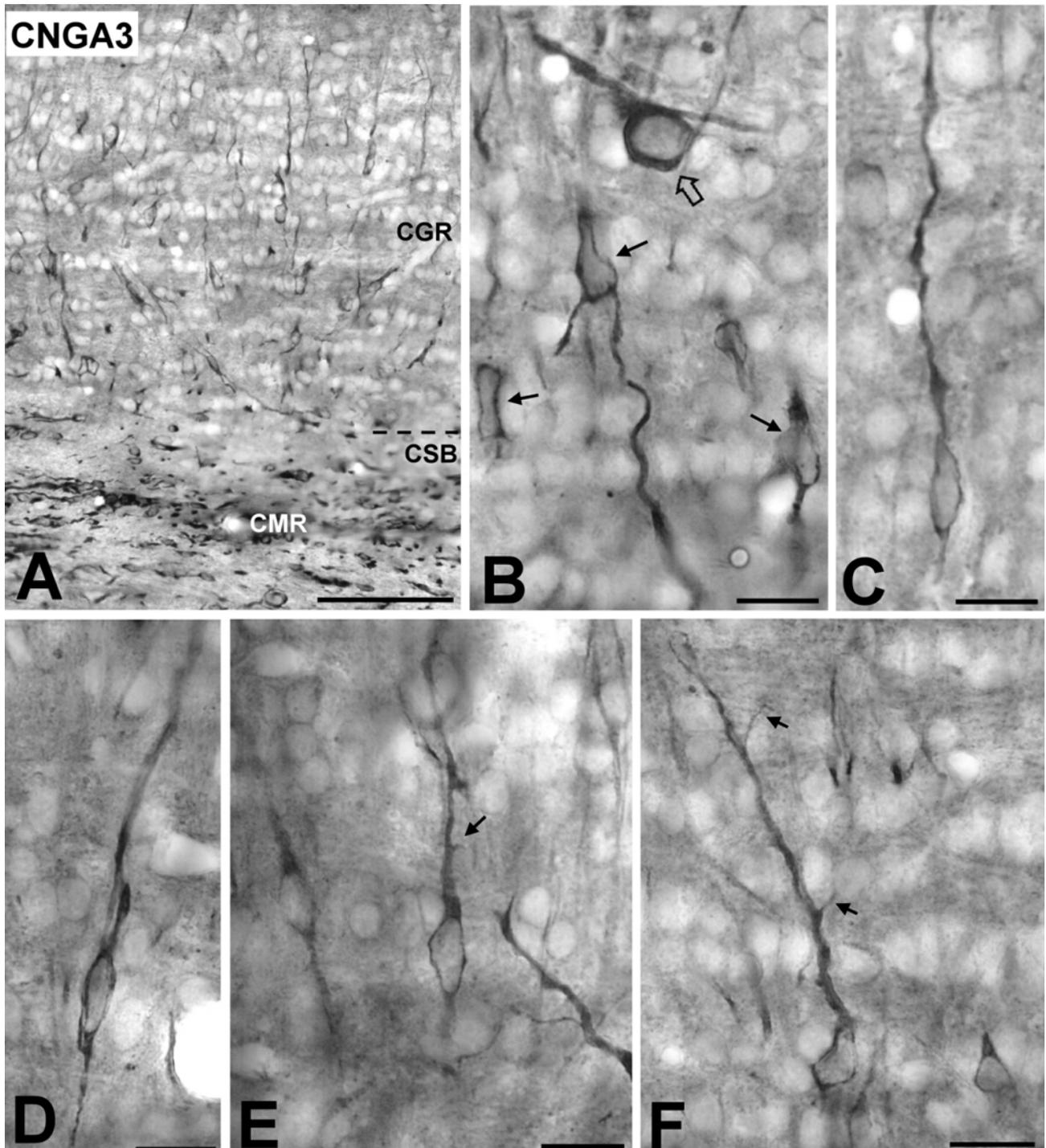


Figura 42. Expresión de CNGA3 en las células de la corriente migratoria rostral.

(A): La corriente migratoria rostral (flechas abiertas) aparece intensamente teñida después de una inmunocitoquímica para CNGA3.

(B): Las células inmunopositivas muestran la disposición y la morfología típica de las células de tipo A vistas a microscopía óptica.

(C): Su análisis a microscopía electrónica confirma que son neuroblastos migrantes o células de tipo A.

(D): Detalle de una célula de tipo B inmunonegativa.

(E) Colocalización de CNGA3 (marcador verde, Cy2) y GCs (marcador rojo, Cy3) en las células de tipo A.

A: células de tipo A; B: células de tipo B. Barras de escala: (A) 100 μm ; (B) 25 μm ; (C) 5 μm ; (D) 2.5 μm (E) 50 μm .

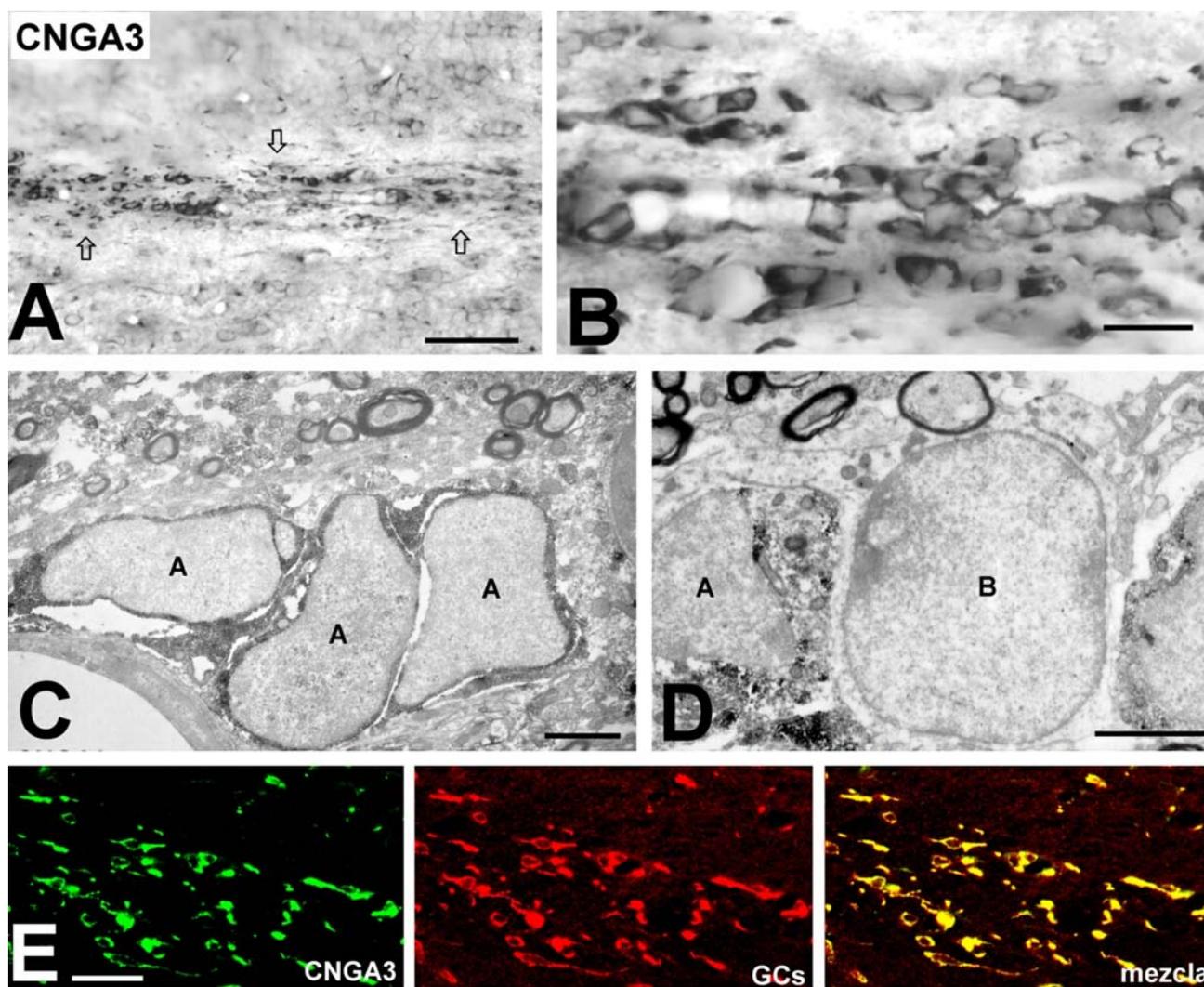


Figura 43. Distribución de HCN1 en el bulbo olfatorio principal.

(A): Vista semipanorámica del bulbo olfatorio principal mostrando el patrón de marcaje para HCN1. La capa plexiforme externa (CPE) es la que presenta mayor intensidad de marcaje.

(B): Detalle de la capa de los glomérulos olfatorios donde aparecen marcados los somas de algunas células empenachadas externas (asteriscos) y de algunas células periglomerulares (flechas).

(C): Colocalización mediante inmunofluorescencia de HCN1 (marcador rojo, Cy3) y nNOS (marcador verde, Cy2). Muchas de las células periglomerulares que contienen HCN1 también contienen nNOS (flechas abiertas).

(D) En la capa plexiforme externa aparece marcaje en los somas de las células empenachadas externas (flechas) que se sitúan en el límite con la capa de los glomérulos olfatorios; además, aparece marcaje por todo el neuropilo.

(E) Las células mitrales (asteriscos) no presentan inmunorreactividad en el soma.

CNO: capa del nervio olfatorio; CGL: capa de los glomérulos olfatorios; CM: capa de las células mitrales; CPI: capa plexiforme interna; CGR: capa de las células granulares. Barras de escala: (A) 50 μm ; (B,C) 15 μm ; (D) 20 μm ; (E) 25 μm .

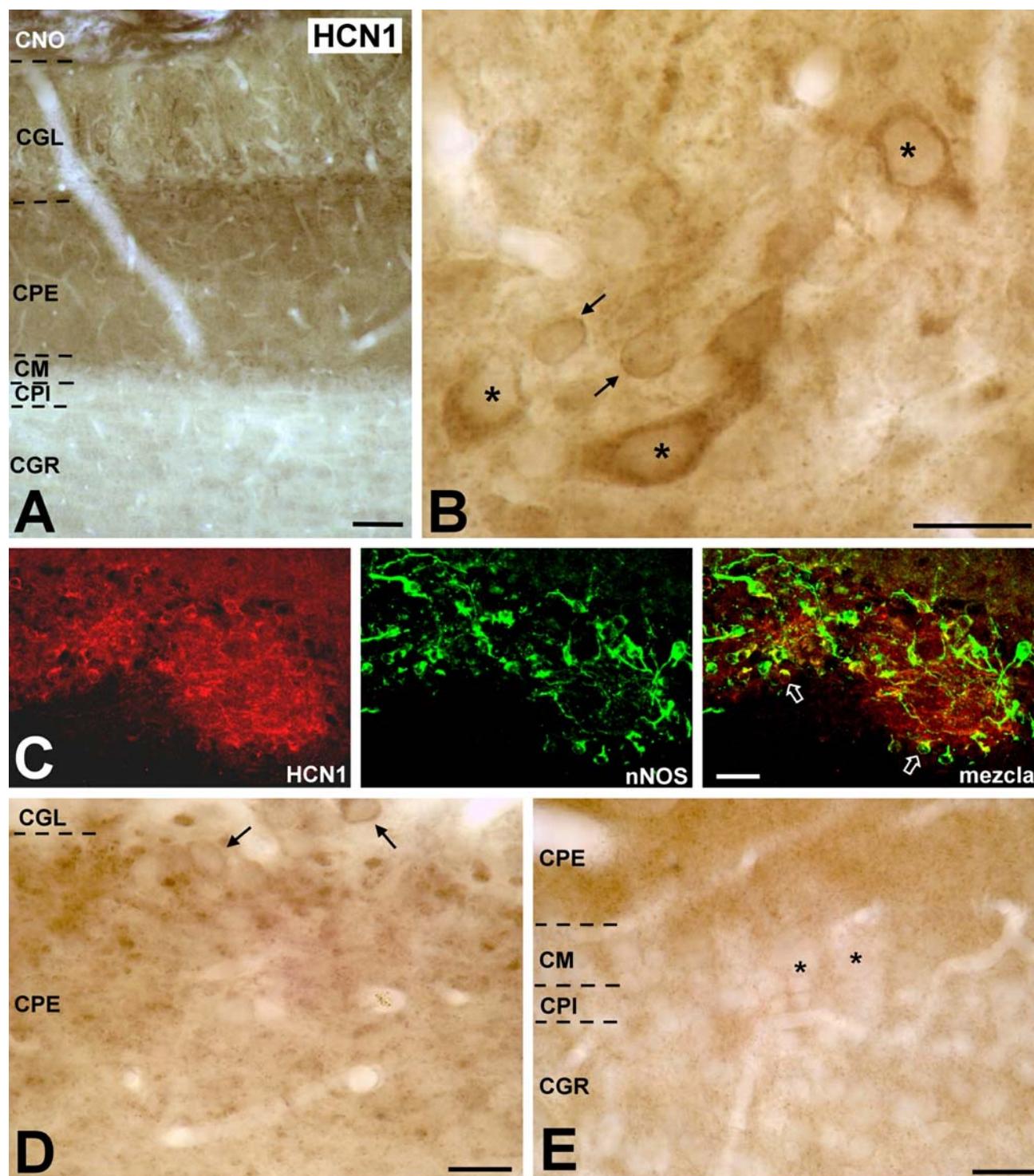


Figura 44. Análisis a microscopía electrónica del marcaje para HCN1 en el neuropilo de la capa plexiforme externa. (I).

Las dendritas de las células principales (M/E) presentan inmunorreactividad para HCN1. El precipitado de DAB en estos perfiles (en A, B y D) queda próximo a la membrana plasmática; en las muestras donde HCN1 se detectó en preinclusión con oro coloidal (C, E y F) se ve como no todas las partículas quedan asociadas a la membrana plasmática. Las flechas abiertas indican contactos sinápticos entre las dendritas de las células principales y las gémulas de células granulares (Gr).

Barras de escala: (A,F) 500 nm; (B,D) 200 nm; (C,E) 1 μ m.

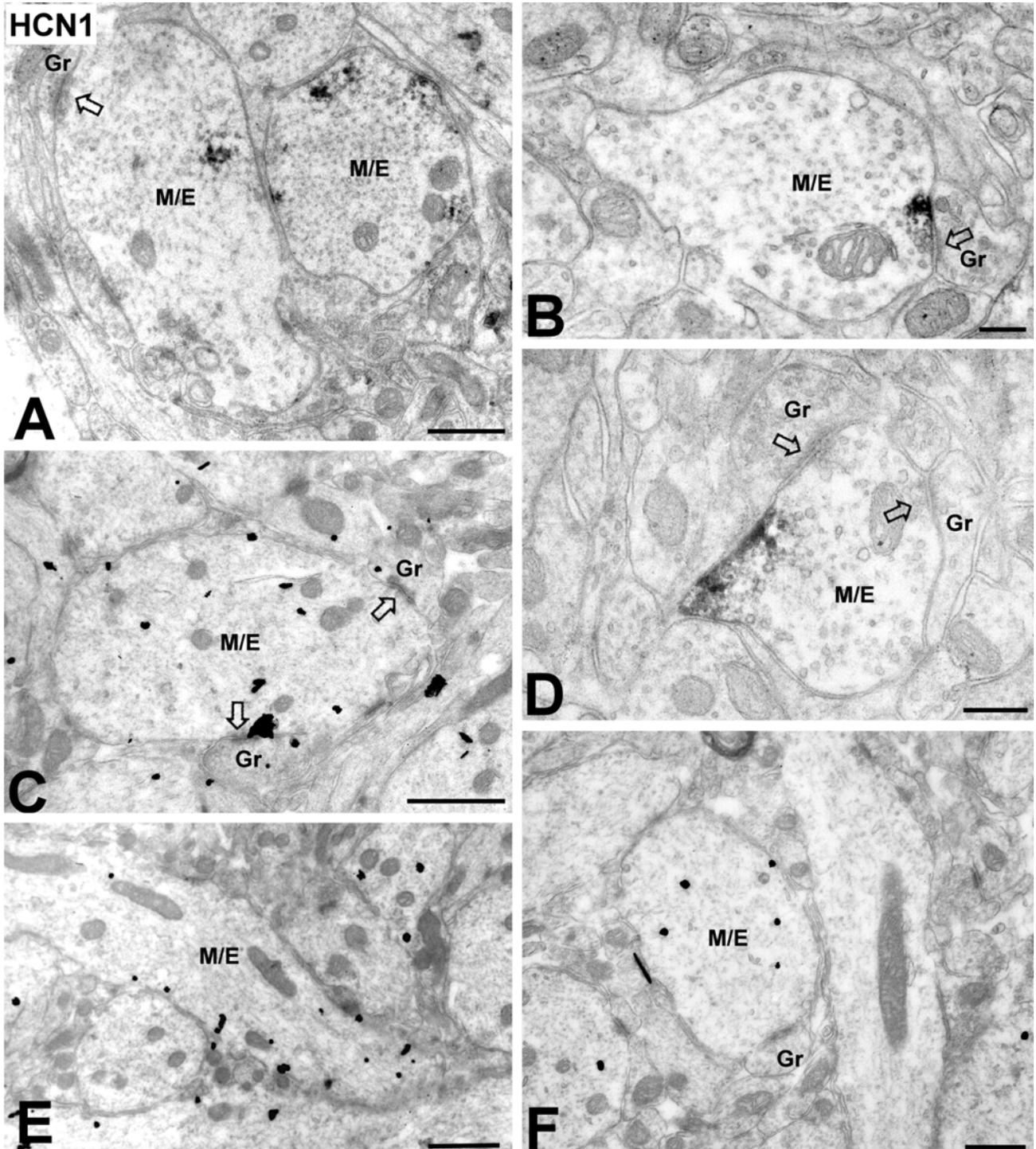


Figura 45. Análisis a microscopía electrónica del marcaje para HCN1 en el neuropilo de la capa plexiforme externa. (II).

Además de en las dendritas de las células principales (M/E), HCN1 aparece en gémulas de células granulares (Gr) y en varicosidades de interneuronas GABAérgicas de la capa plexiforme externa (In).

(A-C): Inmunorreactividad en gémulas de células granulares (Gr).

(D) y (E): Dobles marcajes de HCN1 con DAB en preinclusión (flechas) y de GABA con oro coloidal en postinclusión (cabezas de flecha). Se muestran perfiles pertenecientes a varicosidades de interneuronas GABAérgicas de la capa plexiforme externa (In).

Las flechas abiertas indican señalan contactos sinápticos. Barras de escala: (A,B,D,E) 200 nm; (C) 500 nm.

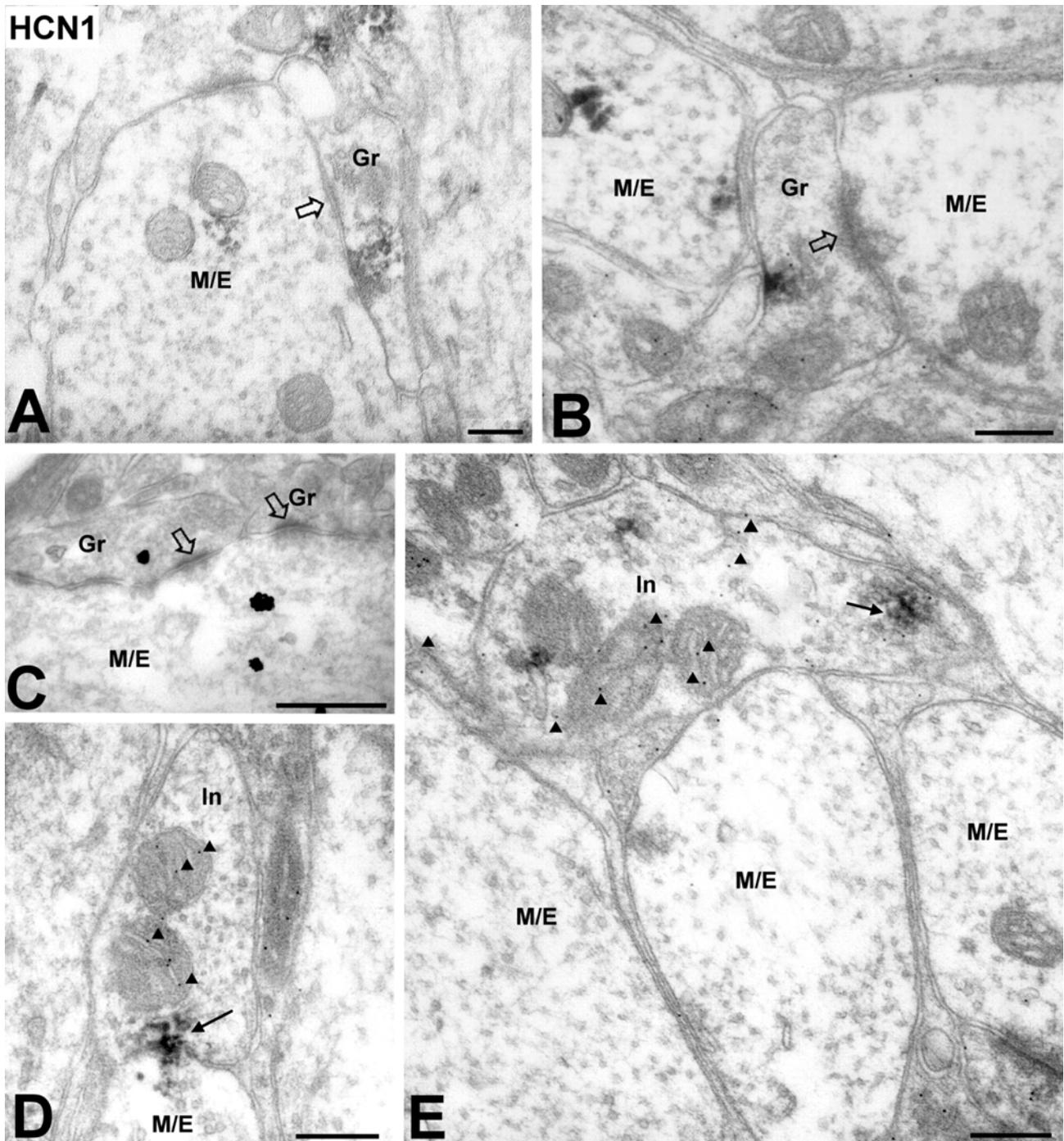


Figura 46. Distribución de HCN2 en el bulbo olfatorio principal.

(A): En una vista semipanorámica del bulbo olfatorio principal, se ve cómo todas las capas contienen elementos inmunopositivos.

(B): Cuando se analizan detenidamente los glomérulos olfatorios, aparecen teñidos dos tipos celulares distintos: células empenachadas externas (asteriscos) y células periglomerulares (flechas).

(C): Somas de células granulares marcados en la capa de las células granulares.

(D): Somas de dos células empenachadas en la capa plexiforme externa (asteriscos). Obsérvese también el neuropilo marcado en esta capa.

CGL: capa de los glomérulos olfatorios; CPE: capa plexiforme externa; CM: capa de las células mitrales. Barras de escala: (A) 100 μm ; (B,C,D) 15 μm .

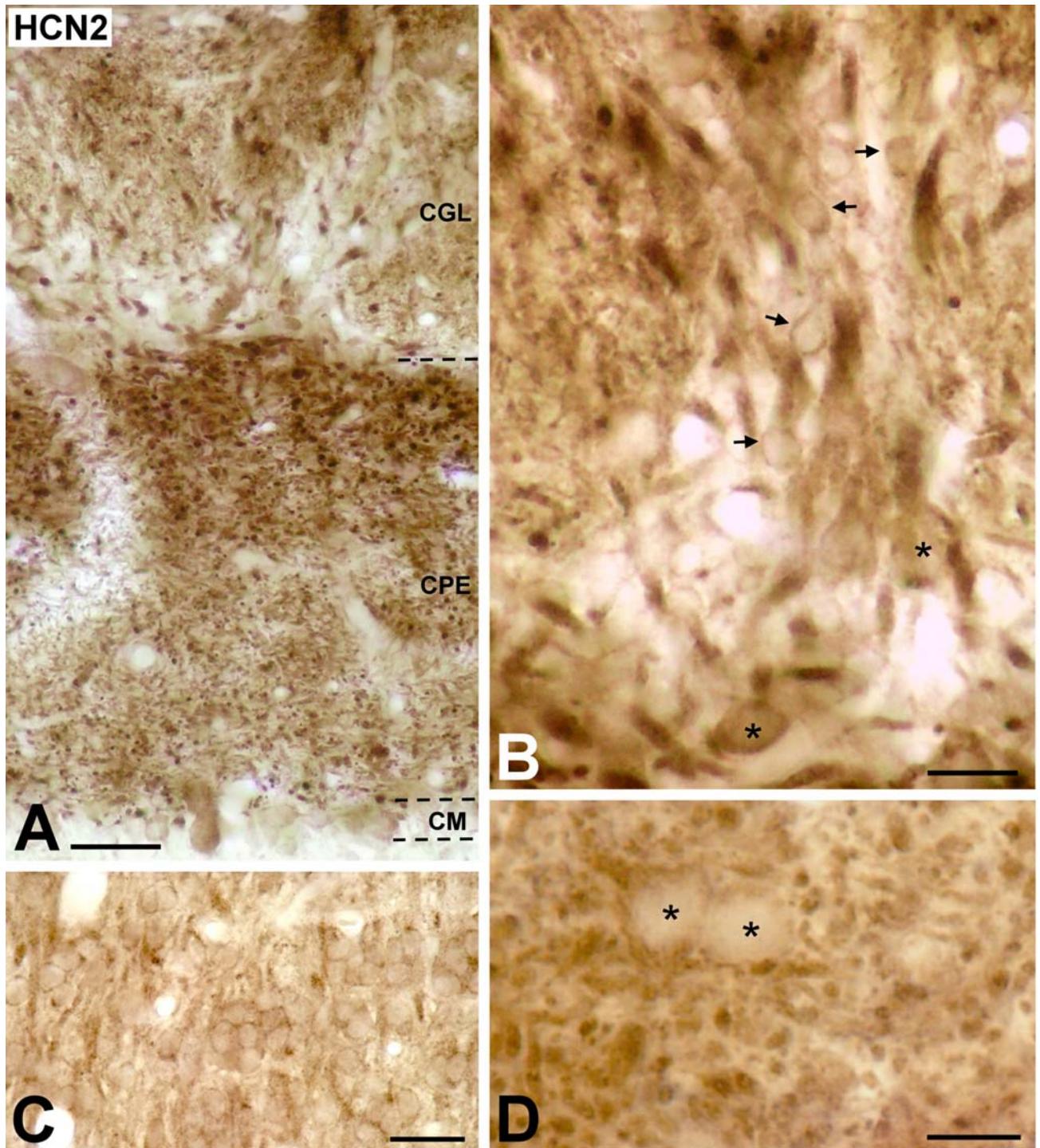


Figura 47. Análisis a microscopía electrónica de la distribución del marcaje de HCN2 en el interior del neuropilo glomerular.

(A): En el compartimento sensorial, se observa el perfil de una célula periglomerular inmunorreactiva (PG) que realiza un contacto sináptico simétrico (flecha abierta) sobre otro perfil inmunonegativo. De este mismo perfil inmunopositivo emerge una espina que recibe un contacto sináptico asimétrico (cabeza de flecha abierta) desde el nervio olfatorio (NO).

(B): Perfil de una célula periglomerular inmunopositiva que realiza un contacto sináptico simétrico (flecha abierta) sobre la dendrita inmunonegativa de una célula principal (M/E).

(C) Doble marcaje de HCN2 con DAB en preinclusión (flechas) y de GABA con oro coloidal en postinclusión (cabezas de flecha). Obsérvese un perfil doblemente marcado (PG).

(D) y (E): Detección de HCN2 con oro coloidal en preinclusión.

(D) Una célula principal positiva realiza un contacto sináptico (flecha abierta) sobre la dendrita de una célula periglomerular negativa. En la misma sección, una célula periglomerular inmunorreactiva realiza un contacto sináptico simétrico (flecha) sobre otro perfil positivo.

(E) En el compartimento sensorial, una célula periglomerular inmunorreactiva recibe un contacto sináptico asimétrico (flecha abierta) desde el nervio olfatorio (NO) y realiza un contacto sináptico simétrico sobre una célula principal también inmunorreactiva. Nótese que el perfil del nervio olfatorio es inmunonegativo.

Barras de escala: 200 nm.

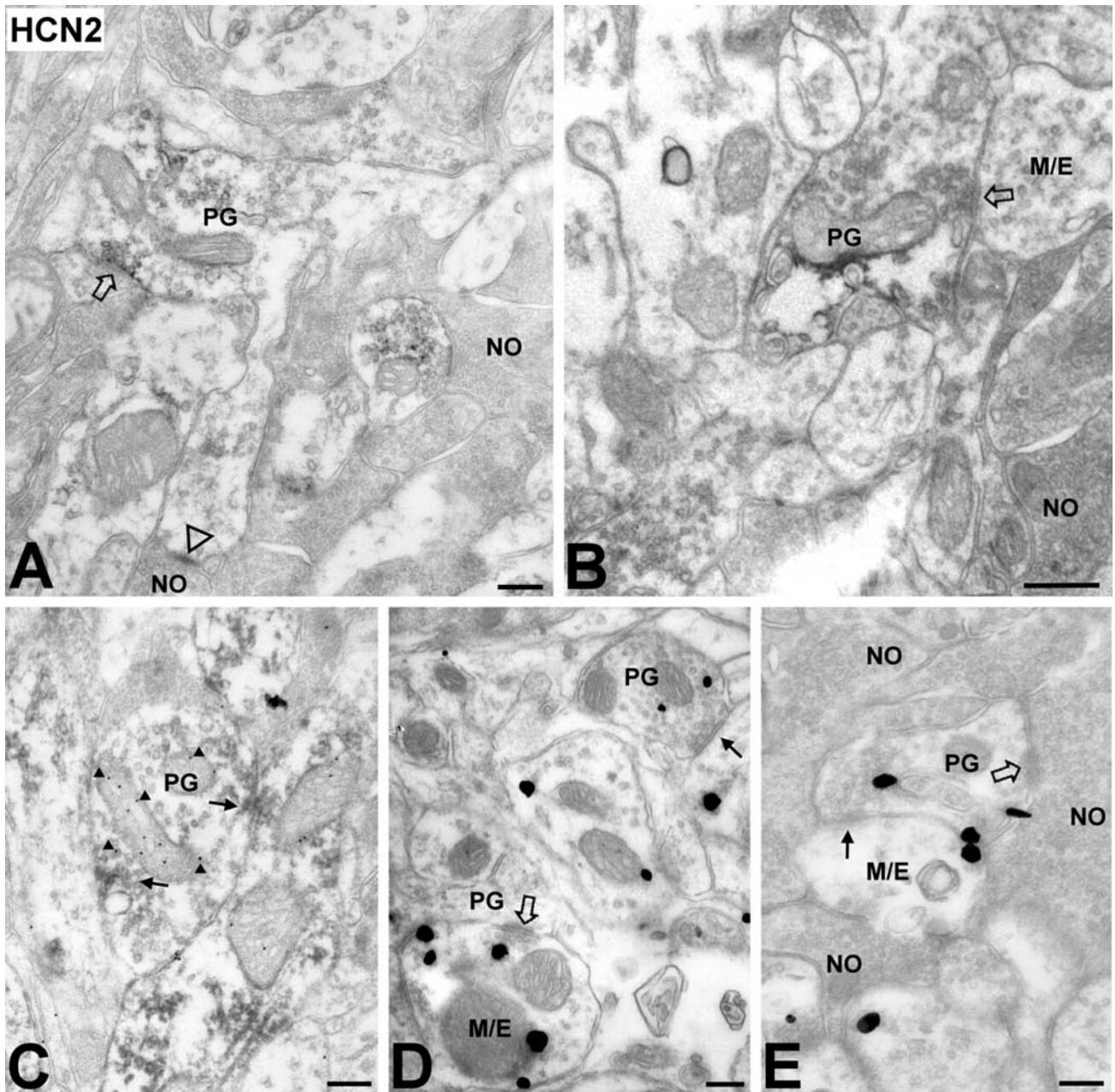


Figura 48. Caracterización neuroquímica de las células periglomerulares que contienen HCN2.

La caracterización neuroquímica de las células periglomerulares HCN2-inmunorreactivas, se realizó mediante dobles marcajes inmunofluorescentes para HCN2 (marcador rojo, Cy3) y TH/nNOS/CB/CR (marcador verde, Cy2) que se analizaron en el microscopio confocal. Las células periglomerulares que contienen HCN2 no presentan TH (A), nNOS (B), CB (C) ni CR (D).

Barras de escala: 20 μm .

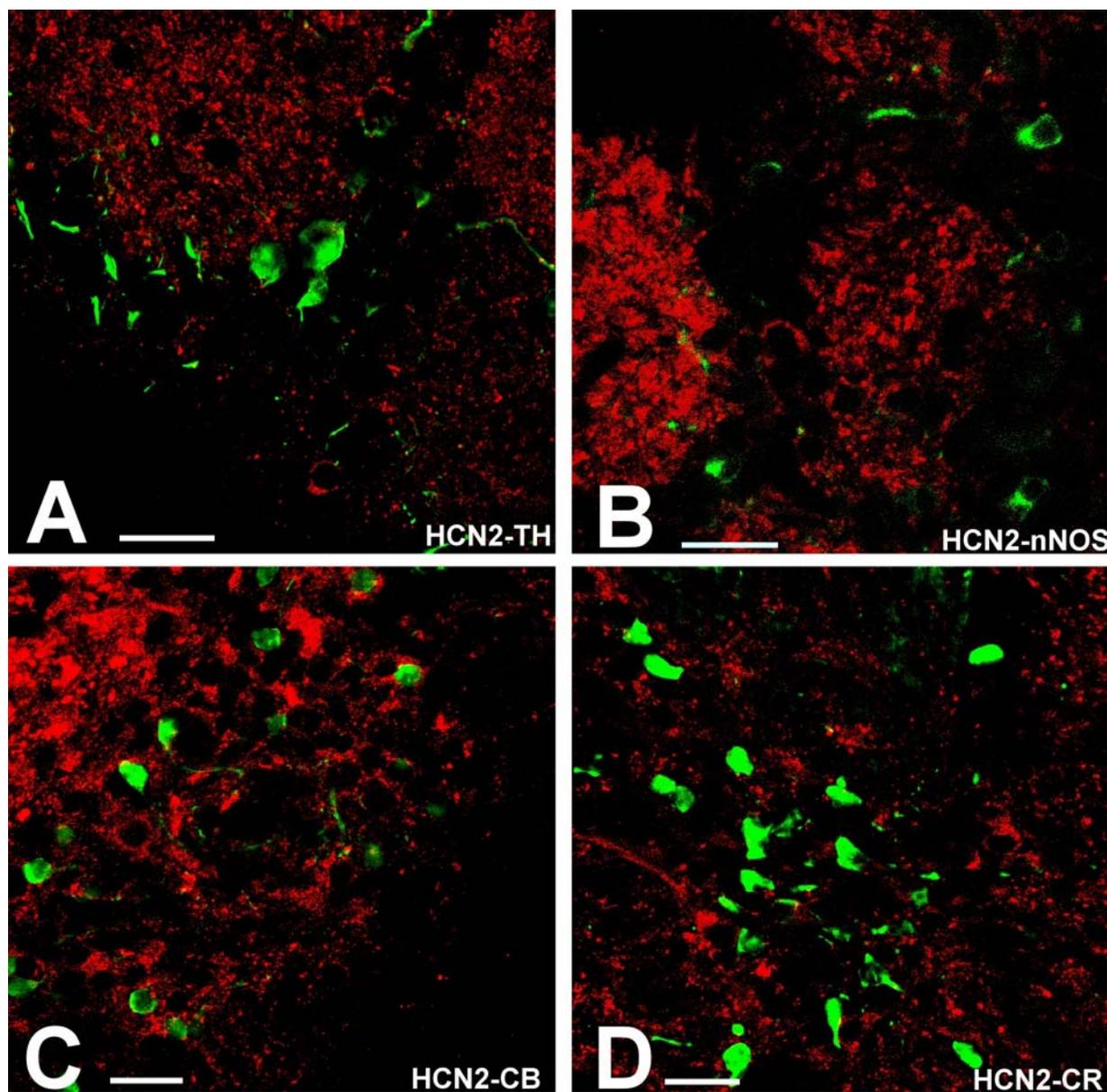


Figura 49. Análisis a microscopía electrónica de la distribución de HCN2 en el neuropilo de la capa plexiforme externa. (I).

(A): Imagen a pocos aumentos donde se observa cómo los perfiles más grandes y electronlúcidos correspondientes a dendritas de células principales (M/E) presentan marcaje. Gran número de las partículas de oro coloidal se localizan sobre la membrana plasmática (flechas). Un perfil de una interneurona GABAérgica de la capa plexiforme externa (In) también es inmunopositivo.

(B-D): Detalles de las dendritas de células principales inmunorreactivas (M/E) estableciendo relaciones sinápticas (flechas abiertas) con las gémulas inmunonegativas de las células granulares (Gr).

Barras de escala: (A) 1 μm ; (B) 500 nm; (C,D) 200 nm.

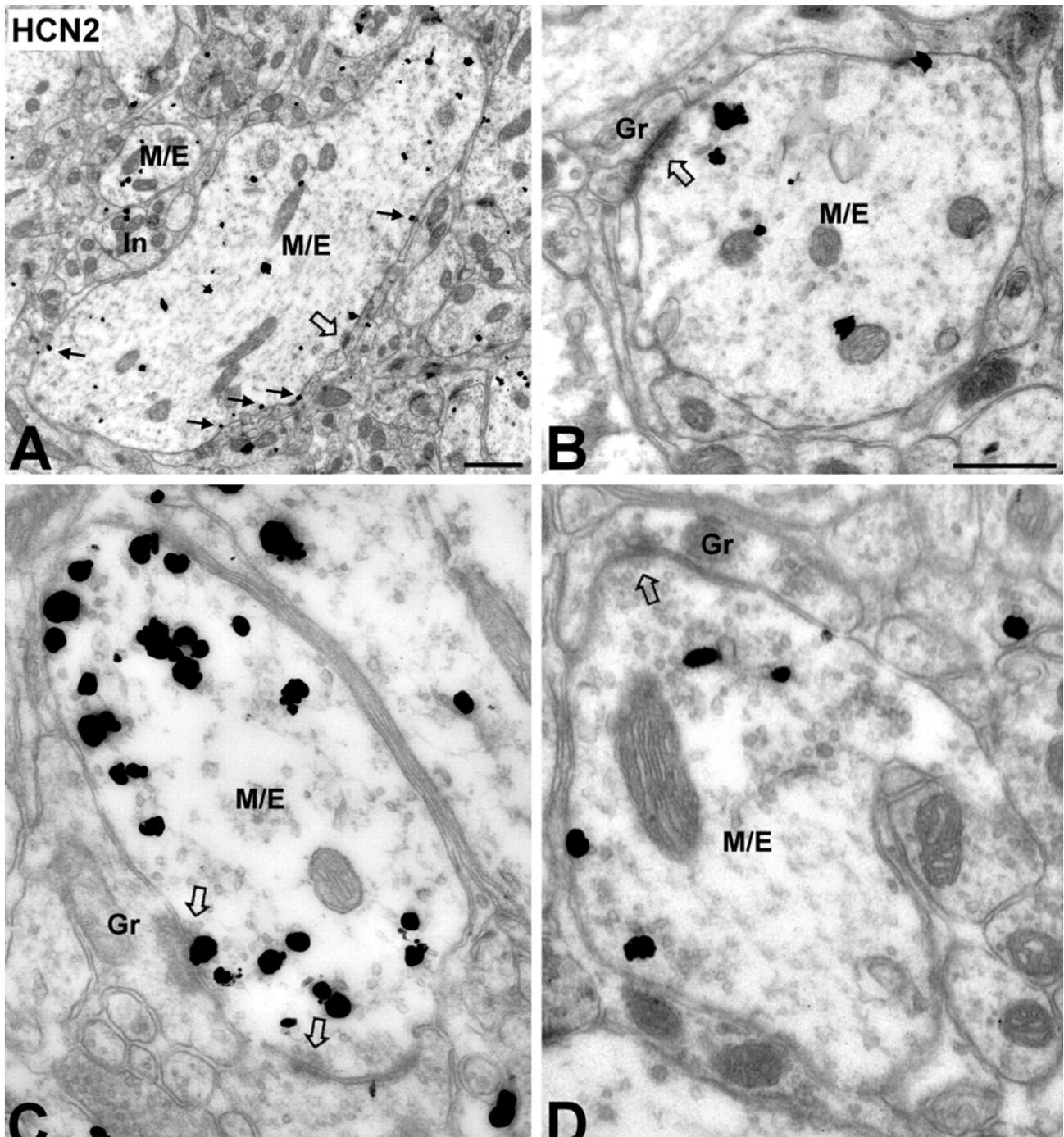


Figura 50. Análisis a microscopía electrónica de la distribución de HCN2 en el neuropilo de la capa plexiforme externa. (II).

(A) y (B): Aparte de encontrar inmunorreactividad en las dendritas de las células principales (M/E), también se ha observado inmunorreactividad en las varicosidades de las interneuronas GABAérgicas de la capa plexiforme externa (In).

(C-F): Las gémulas de las células granulares (Gr) no mostraron inmunorreactividad en ningún caso.

Las flechas abiertas señalan contactos sinápticos. Barras de escala: 250 nm.

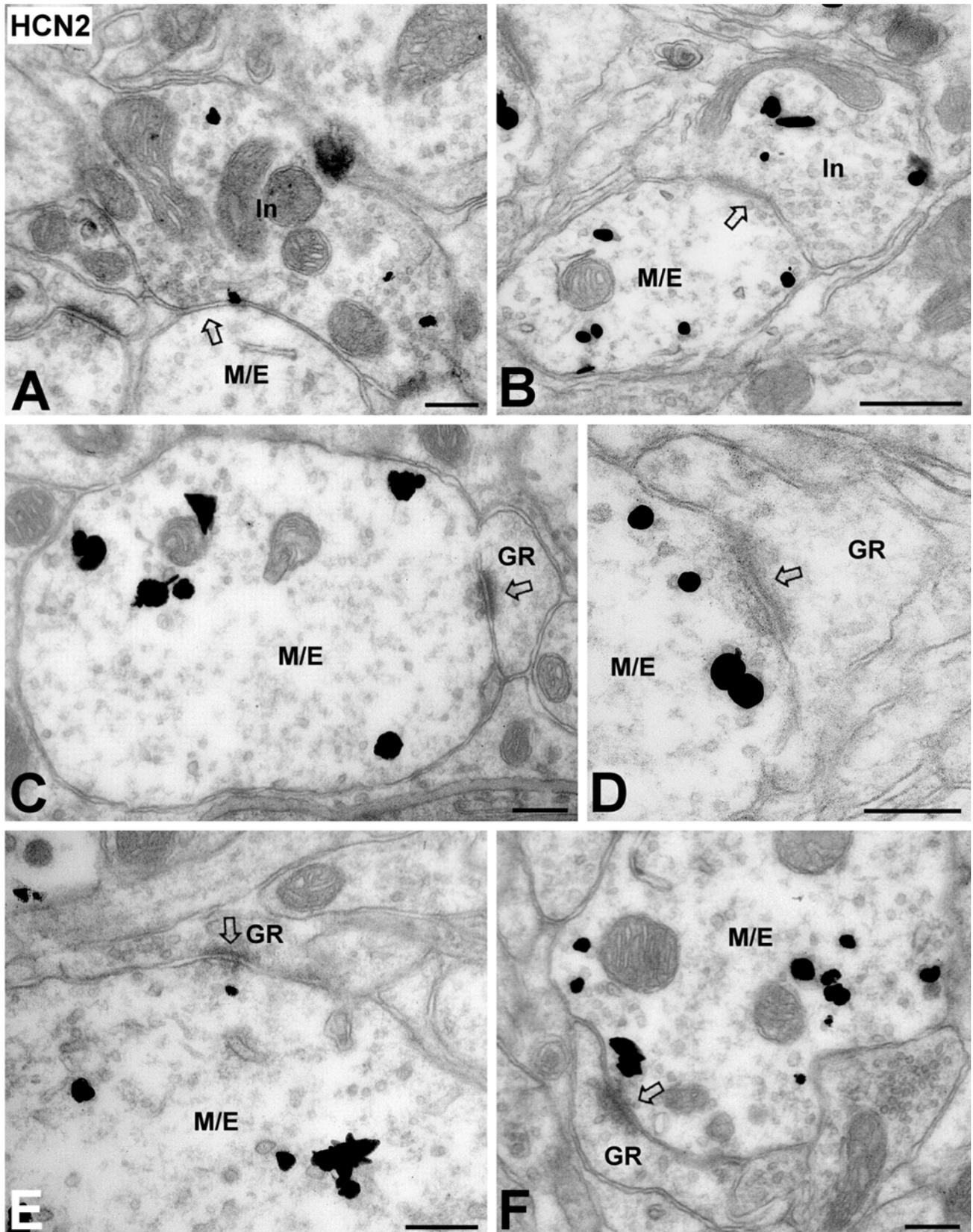


Figura 51. Distribución de HCN4 en el bulbo olfatorio principal.

(A): Vista semipanorámica del bulbo olfatorio principal donde todas las capas aparecen inmunopositivas.

(B) y (C): Detalles de la región periglomerular de los glomérulos olfatorios donde se aprecia el marcaje en el soma de dos tipos celulares distintos: células empenachadas externas (asteriscos) y células periglomerulares (flechas).

(D): En la capa plexiforme externa, el marcaje para HCN4 aparece perfilando las dendritas de las células principales (flechas), pero no se observa marcaje en sus somas.

(E): En la capa de las células mitrales, los somas de estas células (asteriscos) aparecen inmunonegativos.

(F): En la capa de las células granulares, tanto las células granulares (flecha) como algunas células profundas de axón corto (asterisco) presentan inmunorreactividad en el soma.

CGL: capa de los glomérulos olfatorios; CPE: capa plexiforme externa; CM: capa de las células mitrales; CPI: capa plexiforme interna; CGR: capa de las células granulares. Barras de escala: (A) 50 μm ; (B,C,F) 10 μm ; (D,E) 30 μm .

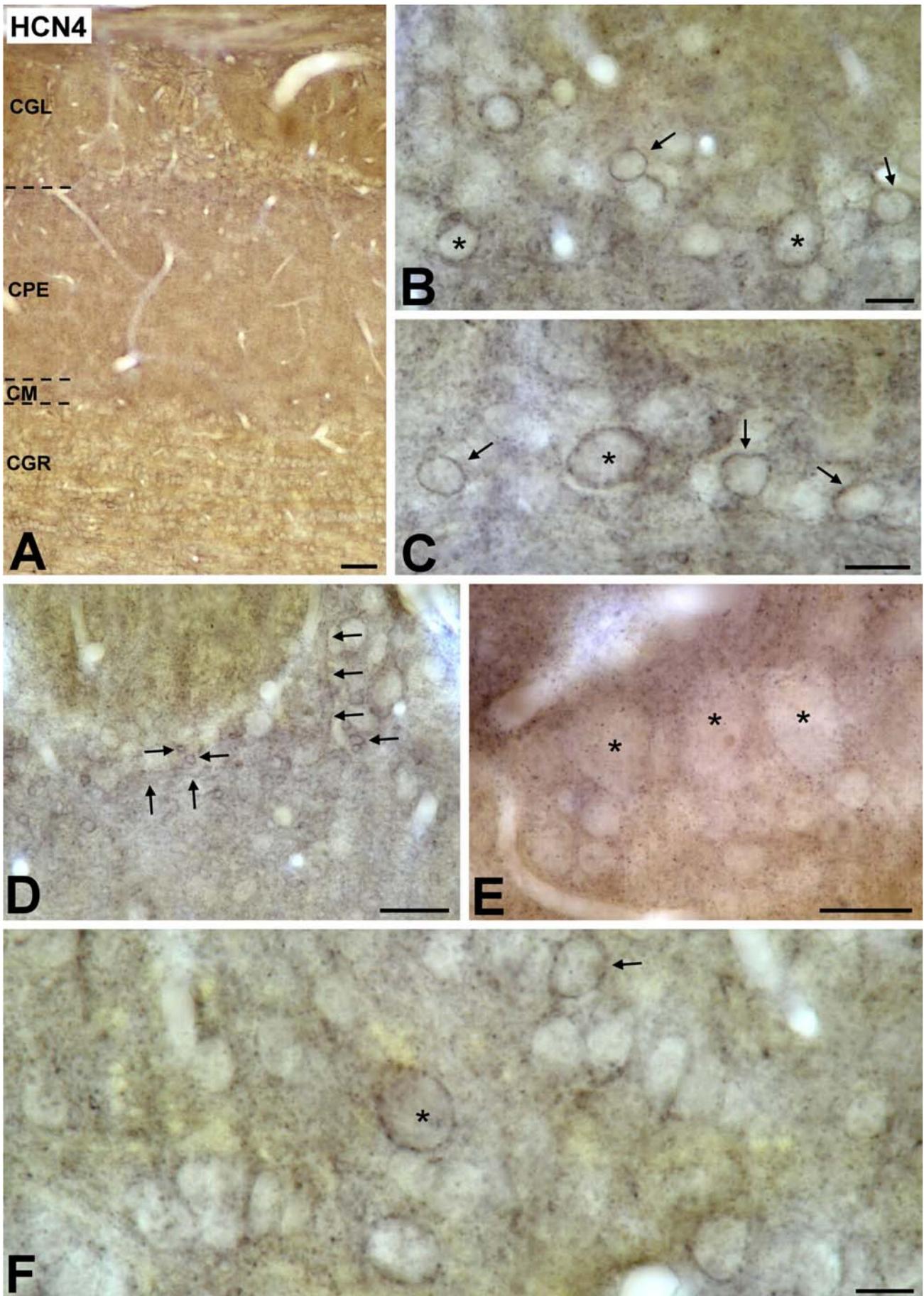


Figura 52. Análisis a microscopía electrónica de la distribución del marcaje para HCN4.

(A): Perfil de una célula periglomerular (PG) inmunopositiva que presenta precipitado de DAB próximo a un contacto sináptico asimétrico (flecha abierta) que recibe desde una célula principal (M/E) inmunonegativa.

(B): Detección de HCN4 con oro coloidal en preinclusión. Se puede observar marcaje en un perfil perteneciente a una célula principal (M/E).

(C): Doble marcaje para HCN4 con DAB en preinclusión (flecha) y para GABA con oro coloidal en postinclusión (cabezas de flecha). Se observa el perfil de una célula periglomerular (PG) doblemente marcado.

(D) y (E): En el neuropilo de la capa plexiforme externa HCN4 aparecen en: dendritas de células principales (M/E), varicosidades de las interneuronas GABAérgicas de la capa plexiforme externa (In), y gémulas de las células granulares (Gr). Nótese en (E) cómo las partículas de oro coloidal se encuentran unidas a la membrana plasmática de la gémula.

Barras de escala: 500 nm.

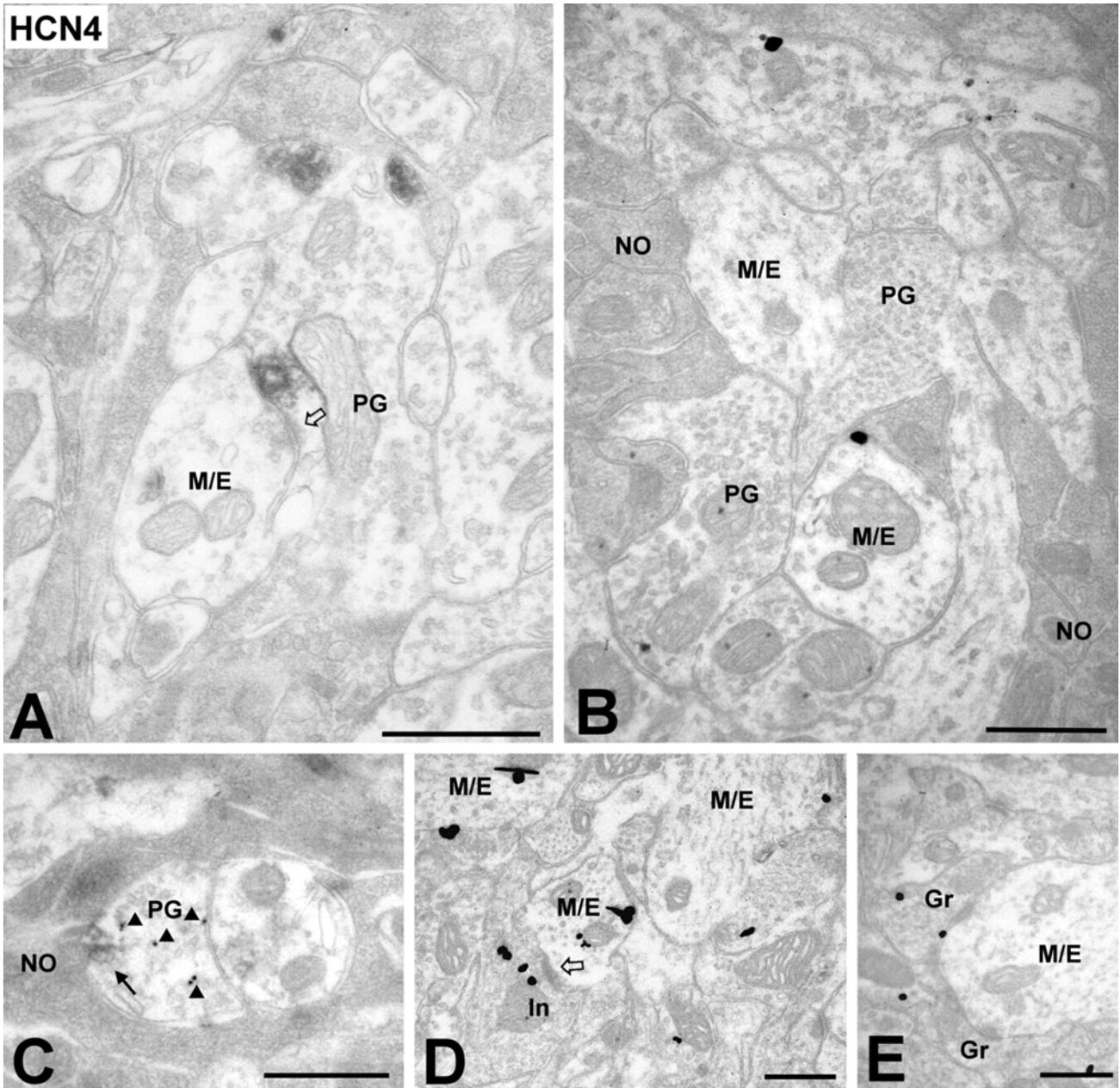


Figura 53. Caracterización neuroquímica de las células HCN4.

La caracterización neuroquímica de las células que contienen HCN4, se realizó mediante dobles marcajes inmunofluorescentes para HCN4 (marcador rojo, Cy3) y TH/nNOS/CB/CR (marcador verde, Cy2) que se analizaron en el microscopio confocal.

(A-D): En la capa de los glomérulos olfatorios las células periglomerulares que contienen HCN4 no presentan TH (A), nNOS (B), CB (C) ni CR (D).

(E): En la capa de las células granulares, algunas células profundas de axón corto que contienen HCN4 también presentan nNOS.

(F): En la capa de la sustancia blanca, las células gigantes expresan tanto HCN4 como CB.

Barras de escala: (A,D,E) 15 μm ; (B,C) 10 μm ; (F) 30 μm .

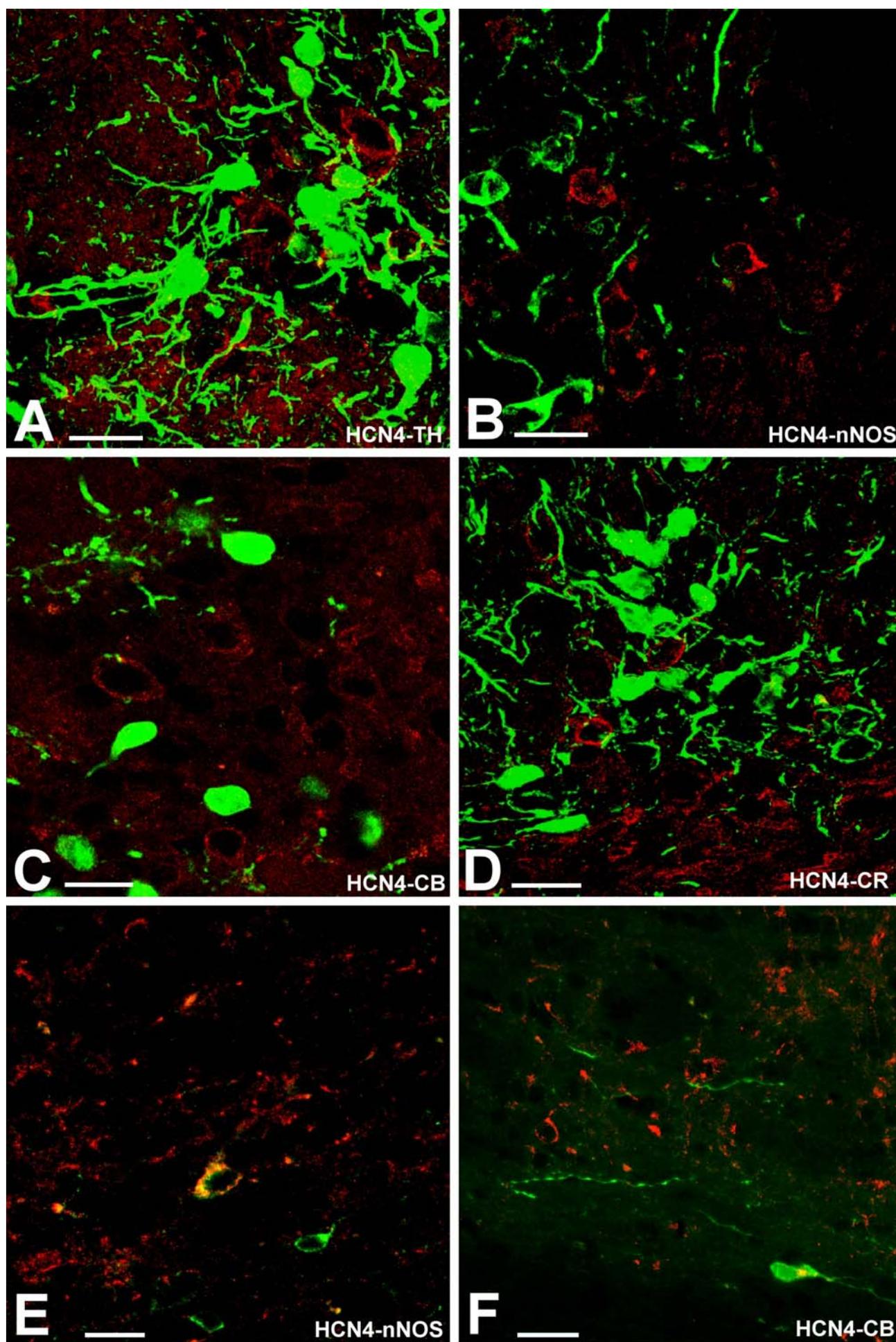


Figura 54. Distribución de PKG1 β en el bulbo olfatorio principal.

(A): Vista semipanorámica del bulbo olfatorio principal donde se observa inmunorreactividad en todas las capas. La capa que mayor inmunorreactividad presenta es la capa plexiforme externa (CPE).

(B): Vista de un glomérulo olfatorio donde aparecen marcados distintos elementos.

(C) y (D): Detalle de las células inmunopositivas de los glomérulos olfatorios. Aparecen marcadas tanto células empenachadas externas (asteriscos), como células periglomerulares (flechas).

(E): Dendrita de una célula principal (M/E) inmunopositiva que recibe un contacto sináptico simétrico (flecha abierta) desde la dendrita de una célula periglomerular (PG) inmunonegativa.

(F): En el compartimento sensorial, la dendrita de una célula periglomerular inmunopositiva recibe contactos sinápticos asimétricos (flechas abiertas) desde terminales del nervio olfatorio (NO) y realiza un contacto sináptico simétrico sobre una célula principal (M/E) (flecha).

(G): Una célula periglomerular inmunopositiva recibe un contacto sináptico asimétrico (flecha abierta) desde una célula principal (M/E).

(H): Dobles marcajes para PKG1 β con DAB (flechas) en preinclusión y para GABA con oro coloidal en postinclusión. Aparecen tres perfiles de células periglomerulares GABAérgicas, de los cuales sólo PG-a y PG-b presentan inmunorreactividad para PKG1 β . Obsérvese cómo el perfil correspondiente a la dendrita de la célula principal, que presenta inmunorreactividad para PKG1 β , es GABAinmunonegativo.

CNO: capa del nervio olfatorio; CGL: capa de los glomérulos olfatorios; CM: capa de las células mitrales; CPI: capa plexiforme interna; CGR: capa de las células granulares. Barras de escala: (A) 50 μ m; (B) 30 μ m; (C,D) 15 μ m; (E-H) 500 nm.

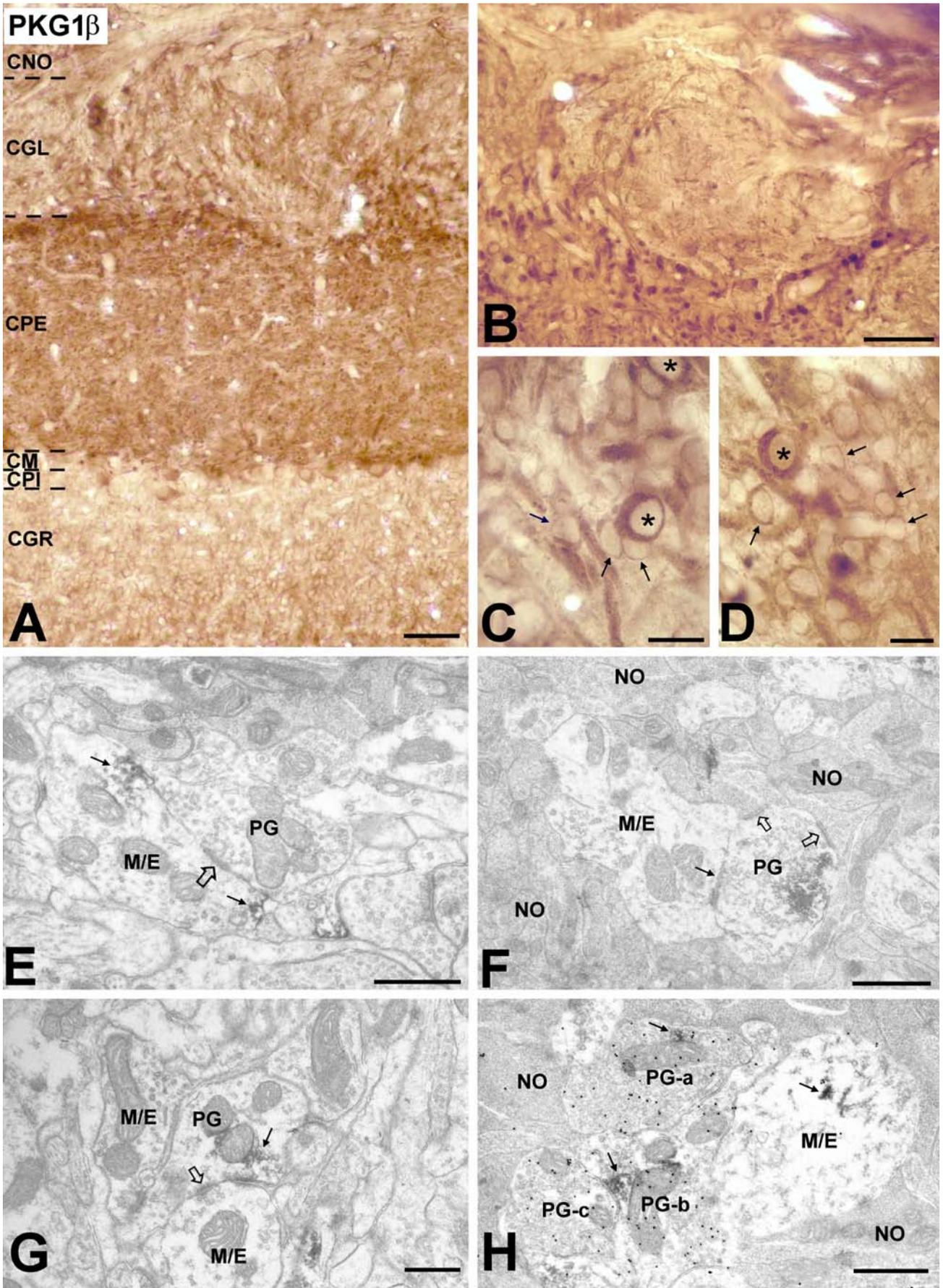


Figura 55. Caracterización neuroquímica de las células que expresan PKG1 β .

La caracterización neuroquímica de las células que expresan PKG1 β se realizó mediante dobles marcajes inmunofluorescentes para PKG1 β (marcador rojo, Cy3) y TH/nNOS/CCK/CR/CB (marcador verde, Cy2) que se analizaron en el microscopio confocal. Las células periglomerulares que contienen PKG1 β no presentan TH (A), nNOS (B), CCK (C) ni CB (E). Por el contrario, sí que existe una colocalización parcial con CR (D). Existe, además, colocalización de PKG1 β y CCK en las células empenachadas externas de los glomérulos olfatorios y de la parte más superficial de la capa plexiforme externa (C).

(F): Detalle del neuropilo glomerular donde se muestra la inexistencia de PKG1 β en las dendritas de las células periglomerulares CB-inmunopositivas.

Barras de escala: 15 μ m.

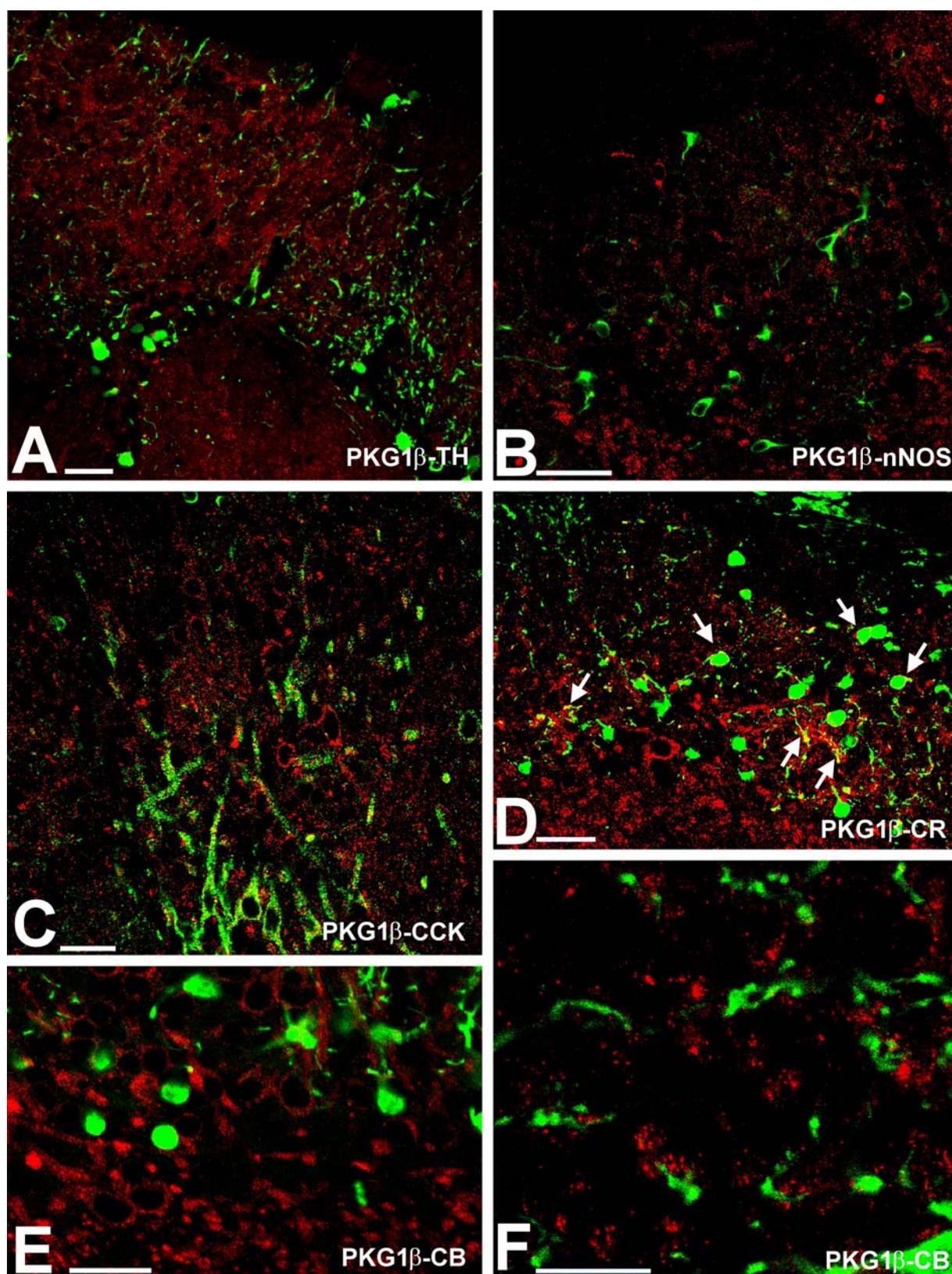


Figura 56. Distribución de PKG1 β en la capa plexiforme externa y en la capa de las células mitrales.

(A) y (B): PKG1 β se encuentra tanto en el soma (asterisco) como en las dendritas (flechas) de las células empenachadas medias e internas.

(C) y (D): También aparecen marcadas las células mitrales. En (D) puede observarse el segmento inicial del axón (flecha abierta).

(E) y (F): Análisis a microscopía electrónica de la distribución de PKG1 β en el neuropilo de la capa plexiforme externa. Se observa que mientras las dendritas de las células principales (M/E) son inmunopositivas, las gémulas de las células granulares (Gr) y de las interneuronas GABAérgicas (In) de la capa plexiforme externa son inmunonegativas.

Barras de escala: (A-D) 25 μ m; (E-F) 500 nm.

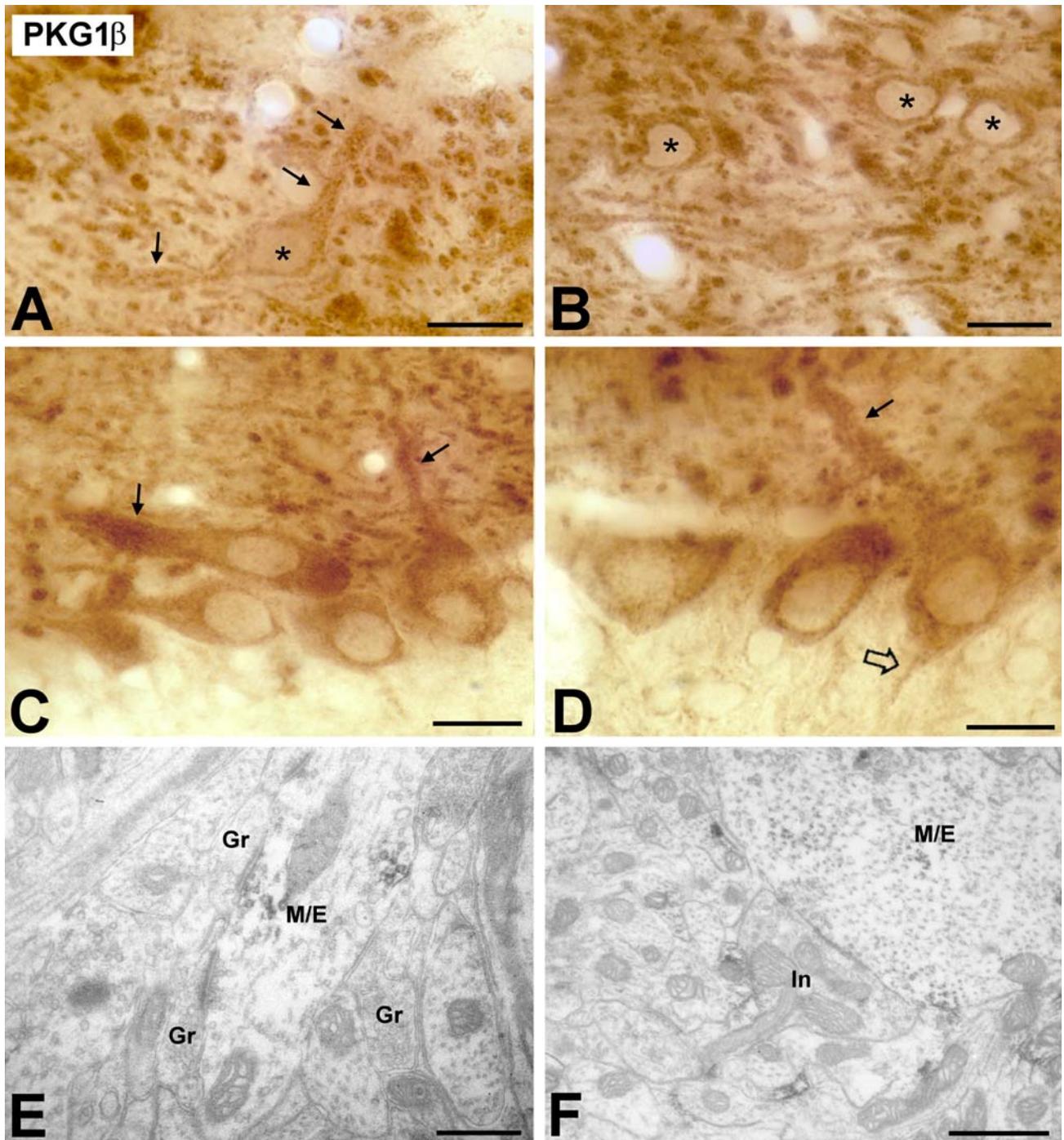


Figura 57. Distribución de PKG2 en el bulbo olfatorio principal.

(A): Vista semipanorámica del bulbo olfatorio principal después de la tinción inmunocitoquímica para PKG2.

(B) y (C): Detalle de los glomérulos olfatorios donde puede observarse la existencia de un ligero marcaje punteado (cabezas de flecha).

(D) Y (E): Análisis a microscopía electrónica de la distribución del marcaje de PKG2 en el bulbo olfatorio principal. Puede observarse la presencia de DAB (flechas) en pequeños perfiles fácilmente identificables como procesos gliales.

(F): Presencia de PKG2 en los somas de las células de Purkinje (flechas).

(G): Inmunorreactividad para PKG2 en la habénula (Hb).

CNO: capa del nervio olfatorio; CGL: capa de los glomérulos olfatorios; CPE: capa plexiforme externa; CM: capa de las células mitrales; CPI: capa plexiforme interna; CGR: capa de las células granulares. Barras de escala: (A,B,F) 50 μm ; (C) 15 μm ; (D,E) 500 nm; (G) 100 μm .

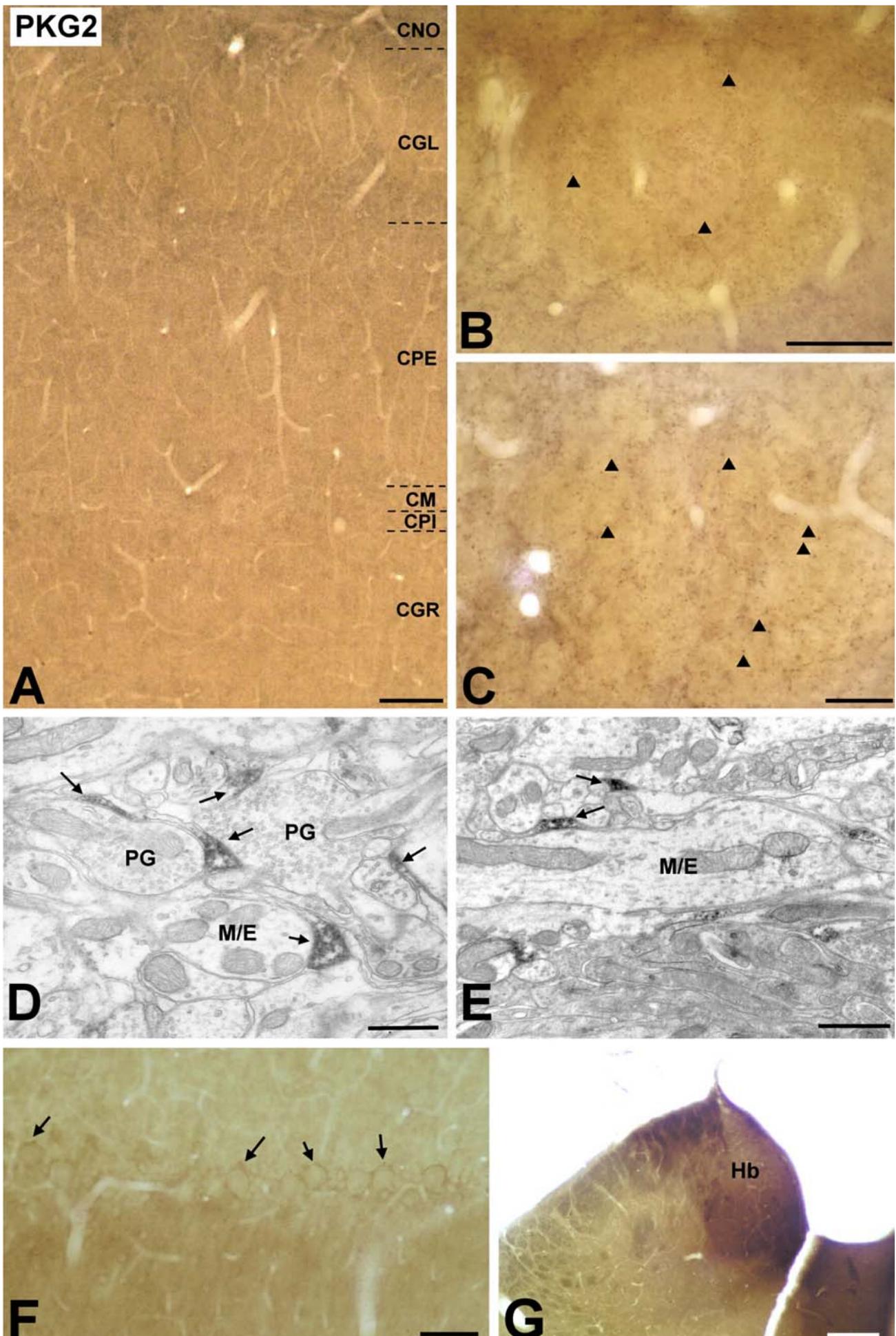


Figura 58. Distribución de PDE5 en el bulbo olfatorio principal.

(A): Vista semipanorámica de la distribución de PDE5 en el bulbo olfatorio principal. Las capas con mayor inmunoreactividad son la capa plexiforme externa (CPE) y la capa de las células granulares (CGR).

(B): Detalle de la capa de los glomérulos olfatorios (CGL) donde se ven marcados los gruesos procesos dendríticos de las células principales penetrando en el neuropilo glomerular (flechas). En el interior del glomérulo olfatorio, además, se aprecian otros procesos mucho más finos (cabezas de flecha).

(C): En la capa de las células mitrales (CM), los somas de las células mitrales (asteriscos) son inmunonegativos. Obsérvese cómo las dendritas de las células granulares (flechas) suben desde las capas inferiores, pasan a través de esta capa perfilando en negativo los somas de las células mitrales y dejan de ser visibles cuando penetran en la capa plexiforme externa.

Barras de escala: (A) 100 μm ; (B) 50 μm ; (C) 20 μm .

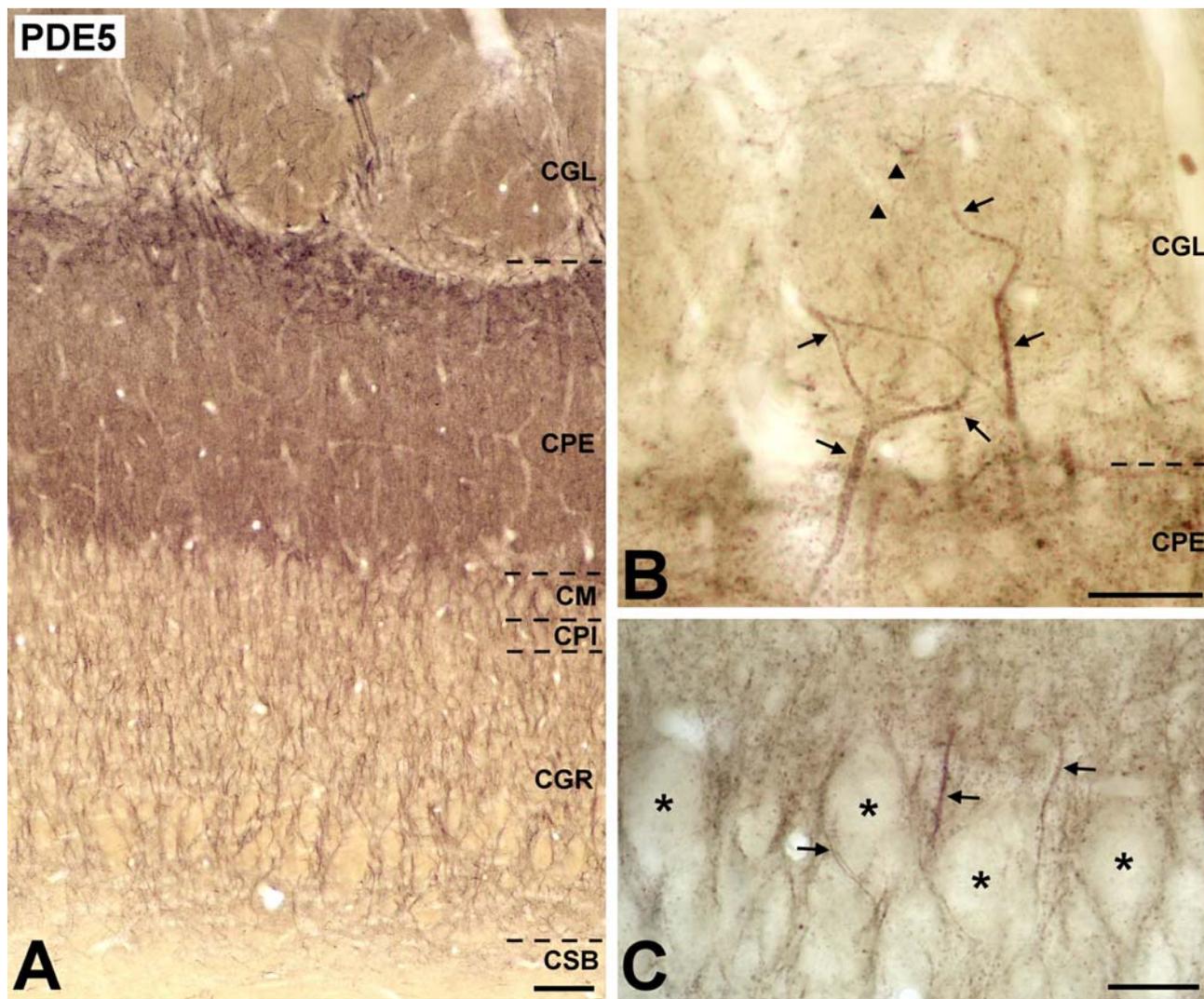


Figura 59. Análisis a microscopía electrónica de la distribución del marcaje para PDE5.

(A) y (B): Presencia de PDE5 en dendritas de células periglomerulares (PG). Las flechas abiertas marcan contactos sinápticos asimétricos recibidos desde células principales (M/E). Nótese que en (B) el precipitado de DAB se encuentra asociado a la especialización postsináptica.

(C) y (D): Marcaje con oro coloidal en preinclusión. En (C) la dendrita de una célula principal inmunopositiva realiza dos contactos sinápticos asimétricos (flechas abiertas) sobre dos gémulas de células periglomerulares. En (D), una célula periglomerular inmunopositiva recibe un contacto sináptico asimétrico (flecha abierta) desde una célula principal también inmunopositiva. Nótese que no aparece marcaje en el nervio olfatorio (NO).

(E) y (F): Doble marcaje inmunocitoquímico para GCs, detectada con DAB en preinclusión, y para PDE5, detectada con oro coloidal (cabeza de flecha) también en preinclusión. Obsérvese cómo los dos perfiles mostrados de células periglomerulares presentan tanto GCs como PDE5.

(G) y (H): En la capa plexiforme externa, sólo las dendritas de las células principales (M/E) presentan inmunorreactividad para PDE5. Obsérvese cómo las gémulas de las células granulares (Gr) son negativas. Las fechas indican el precipitado de DAB y las flechas abiertas, los contactos sinápticos entre las dendritas de las células principales y las gémulas de las células granulares.

Barras de escala: (A-F,H) 500 nm; (G) 1µm.

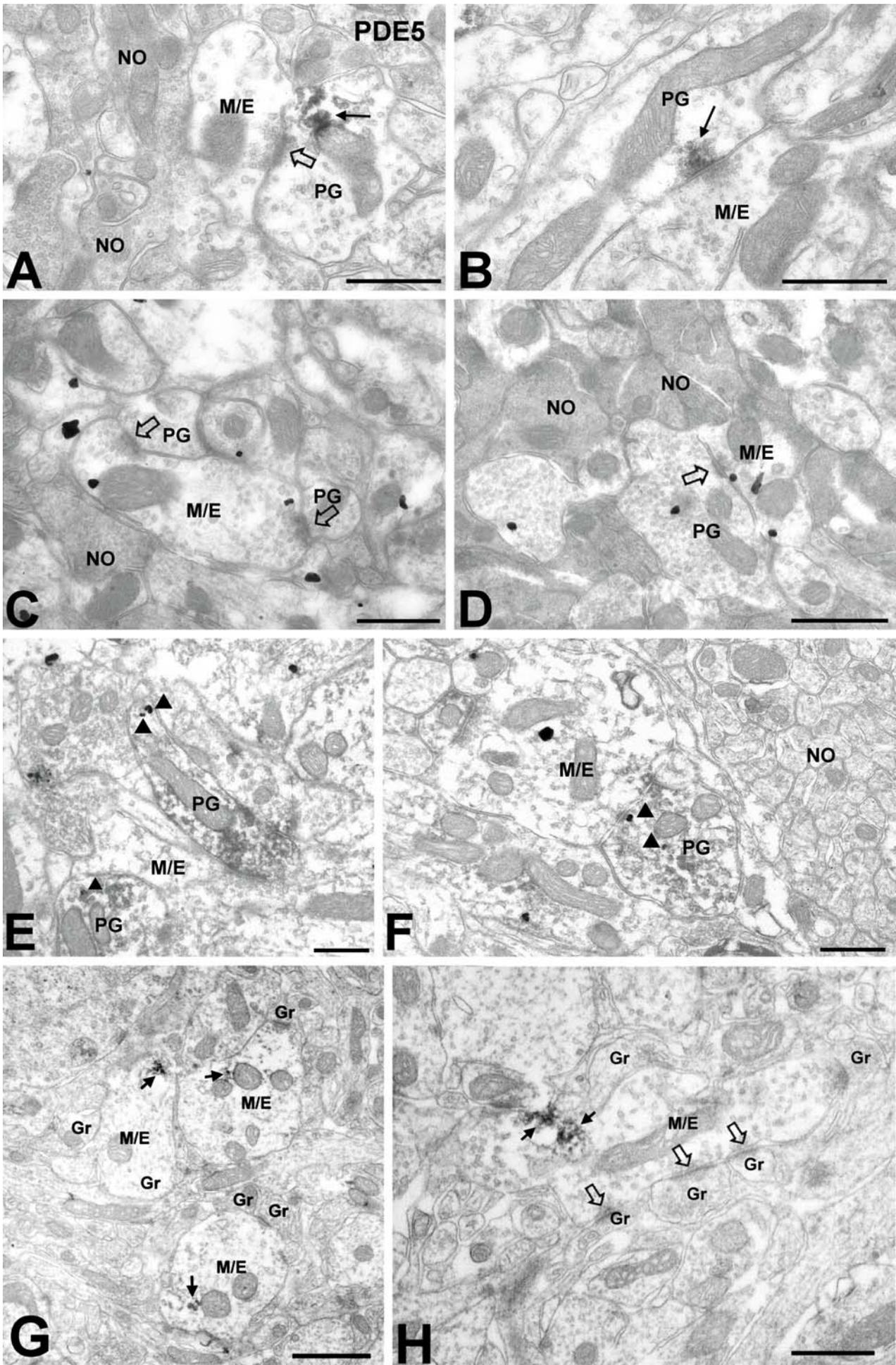


Figura 60. **Distribución del marcaje para proteínas S-Nitrosiladas.**

(A-C): Las células que presentan inmunorreactividad en el bulbo olfatorio se encuentran en la capa de la sustancia blanca y están integradas en la corriente migratoria rostral. Son escasas y no se encuentran agrupadas formando cadenas. La célula positiva mostrada en (B) se encuentra próxima a un pequeño grupo de células negativas (flechas) que está asociado a un vaso sanguíneo como hacen las cadenas de células de tipo A.

D) y (E): Células con proteínas S-Nitrosiladas en la zona subventricular.

Barras de escala: (A-C) 15 μm ; (D,E) 30 μm .

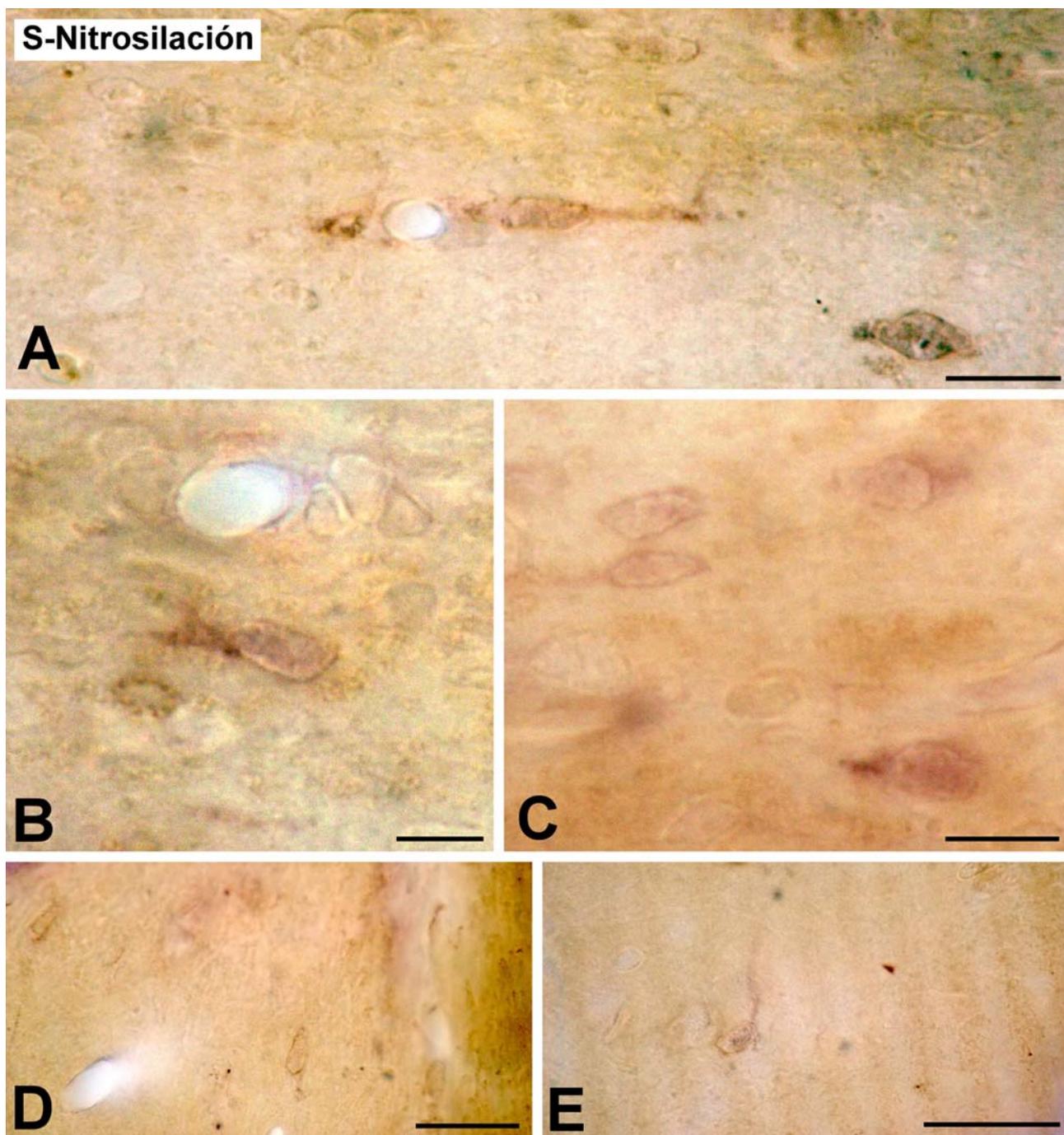


Figura 61. Distribución del receptor D2 de dopamina en los glomérulos olfatorios.

(A): Inmunocitoquímica para el receptor D2 de dopamina en los glomérulos olfatorios (g). Se observa un intenso marcaje punteado (flechas), aunque los elementos inmunopositivos no pueden ser identificados.

(B-D): Distribución del receptor D2 de dopamina en los terminales axónicos del nervio olfatorio (NO). Las partículas de oro coloidal (flechas) aparecen unidas a la membrana plasmática. Obsérvese cómo el receptor se encuentra frecuentemente asociado a los contactos sinápticos asimétricos que el nervio olfatorio realiza sobre dendritas de las células principales (M/E) o sobre las gémulas de las células periglomerulares (PG).

(E-H): A más aumentos se ve claramente que las partículas de oro coloidal están en la membrana plasmática presináptica, nunca en la postsináptica.

Barras de escala: (A) 50 μ m; (B,C,D) 400 μ m; (E,F,G,H) 150 μ m.

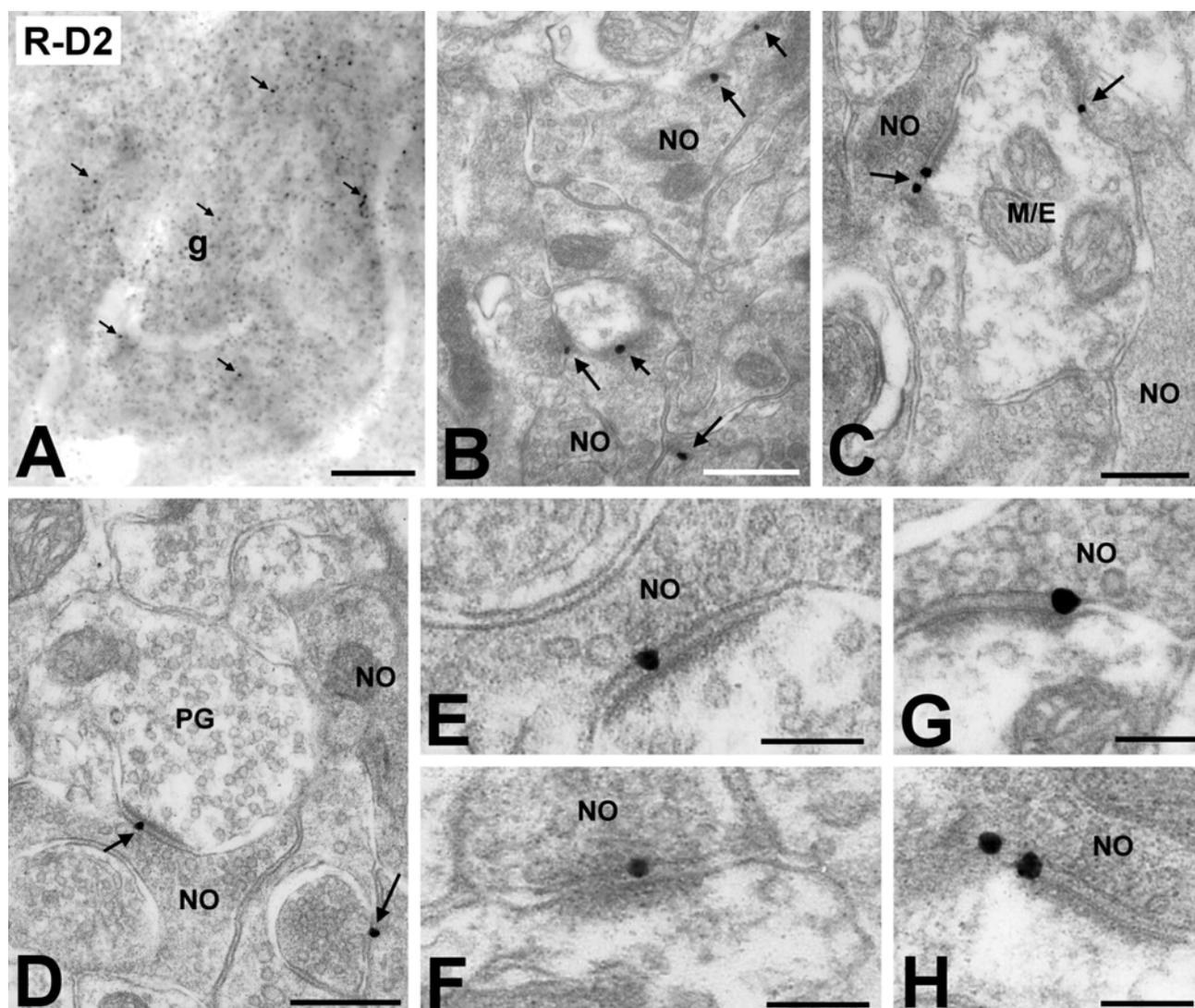


Figura 62. Distribución del receptor D2 de dopamina en las porciones intraglomerulares de las dendritas de las células principales.

(A): Sección longitudinal de una gruesa ramificación de una dendrita de una célula principal (M/E) inmunopositiva (flechas). El área enmarcada muestra una partícula de oro coloidal unida a la membrana plasmática presináptica de un contacto sináptico asimétrico que realiza la célula principal sobre la gémula de una célula periglomerular (PG). Este área se encuentra aumentada en (G). Nótese cómo las partículas de oro coloidal se encuentran ancladas a la membrana presináptica.

(B-D): Perfil dendrítico de una célula principal mostrando inmunorreactividad (flechas) en tres secciones ultrafinas seriadas. Nótese como en (C) y (D) hay partículas de oro coloidal (cabezas de flecha) localizadas en la membrana presináptica del contacto sináptico asimétrico que realiza la célula principal sobre la espina (es) de una posible célula periglomerular. Este contacto se muestra aumentado en la esquina inferior izquierda de ambas figuras.

(E): Una célula principal recibe una sinápsis (flecha abierta) desde el nervio olfatorio (NO) y, a su vez, realiza una sinápsis sobre la gémula de una célula periglomerular. En este contacto, el receptor D2 de dopamina aparece unido a la especialización presináptica (cabeza de flecha).

(F): Localización presináptica del receptor (flecha) en un contacto sináptico asimétrico desde una célula principal sobre una célula periglomerular. Este contacto se encuentra aumentado en (H). Nótese cómo en todos los contactos las partículas de oro coloidal se encuentran ancladas a la membrana presináptica.

Barras de escala: (A,B,C,D,E) 500 nm; (F) 250 nm; (G,H) 150 nm.

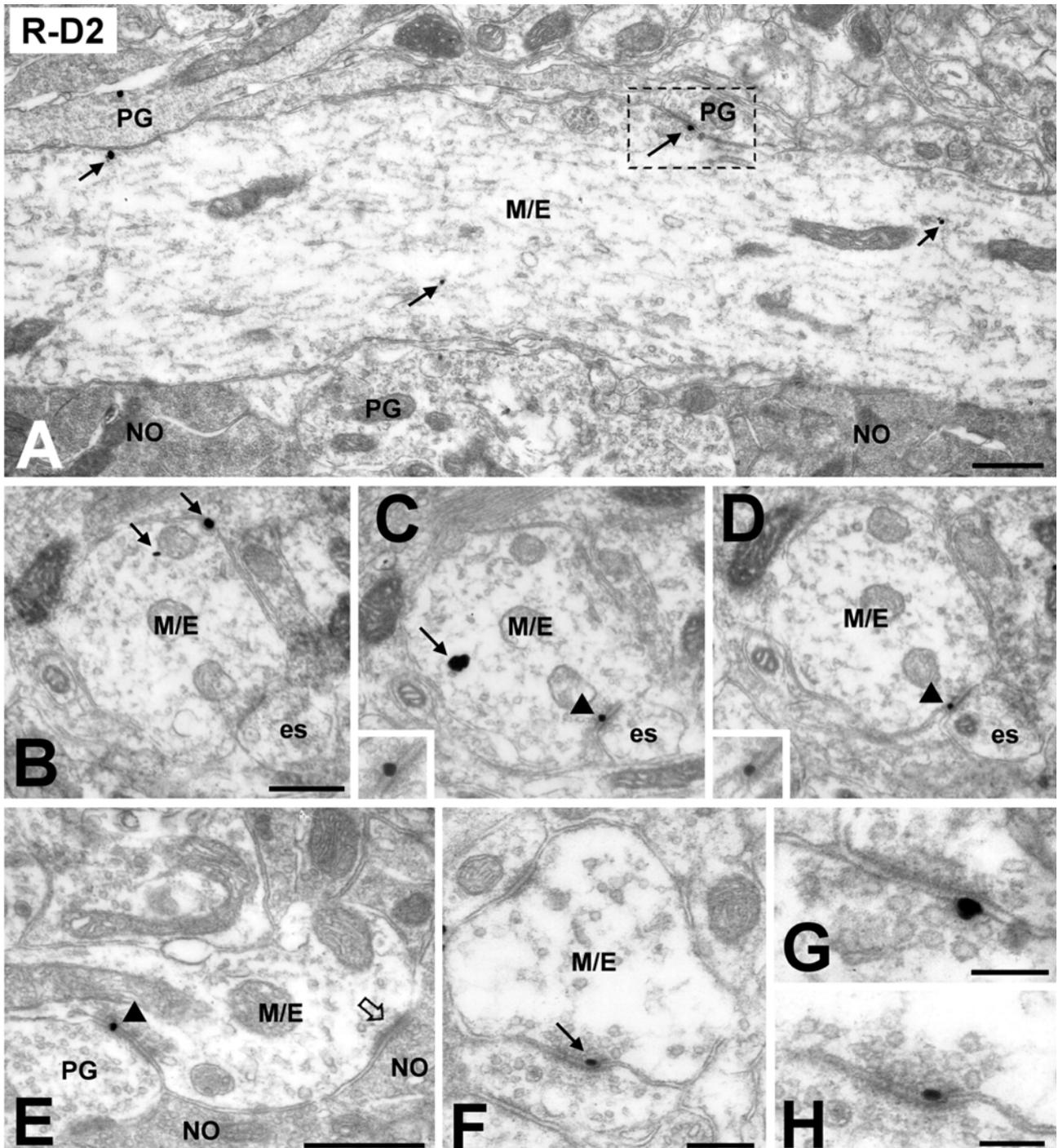


Figura 63. Distribución del receptor D2 de dopamina en las porciones intraglomerulares de las dendritas de las células periglomerulares.

(A-D): Gémula de una célula periglomerular (PG-a) que contiene el receptor D2 de dopamina (flecha) mostrada en cuatro secciones ultrafinas adyacentes. Próxima a ella, se muestran otras dos gémulas de células periglomerulares (PG-b y PG-c) que no tienen marcaje en ninguno de los cuatro cortes. Las flechas abiertas señalan una sinápsis desde una célula principal (M/E) sobre PG-a.

(E): Tríada de contactos sinápticos en el compartimento sensorial del neuropilo glomerular. El nervio olfatorio (NO) realiza una sinapsis sobre el perfil dendrítico de una célula principal (M/E) y otra sobre la gémula de una célula periglomerular (PG) (flechas abiertas). A su vez, la célula periglomerular realiza una sinápsis asimétrica sobre la célula principal. Nótese que el receptor D2 de dopamina (flecha) se localiza presinápticamente, tanto en el contacto sináptico asimétrico que realiza el nervio olfatorio sobre la célula principal como en el contacto sináptico simétrico que realiza la célula periglomerular sobre la célula principal. El contacto sináptico simétrico se encuentra aumentado en la esquina inferior derecha.

(F): El receptor D2 de dopamina (flecha) aparece presinápticamente localizado en un contacto sináptico simétrico que una célula periglomerular (PG) realiza sobre una célula principal (M/E). Este contacto se encuentra aumentado en la esquina inferior derecha.

Barras de escala: 400 nm.

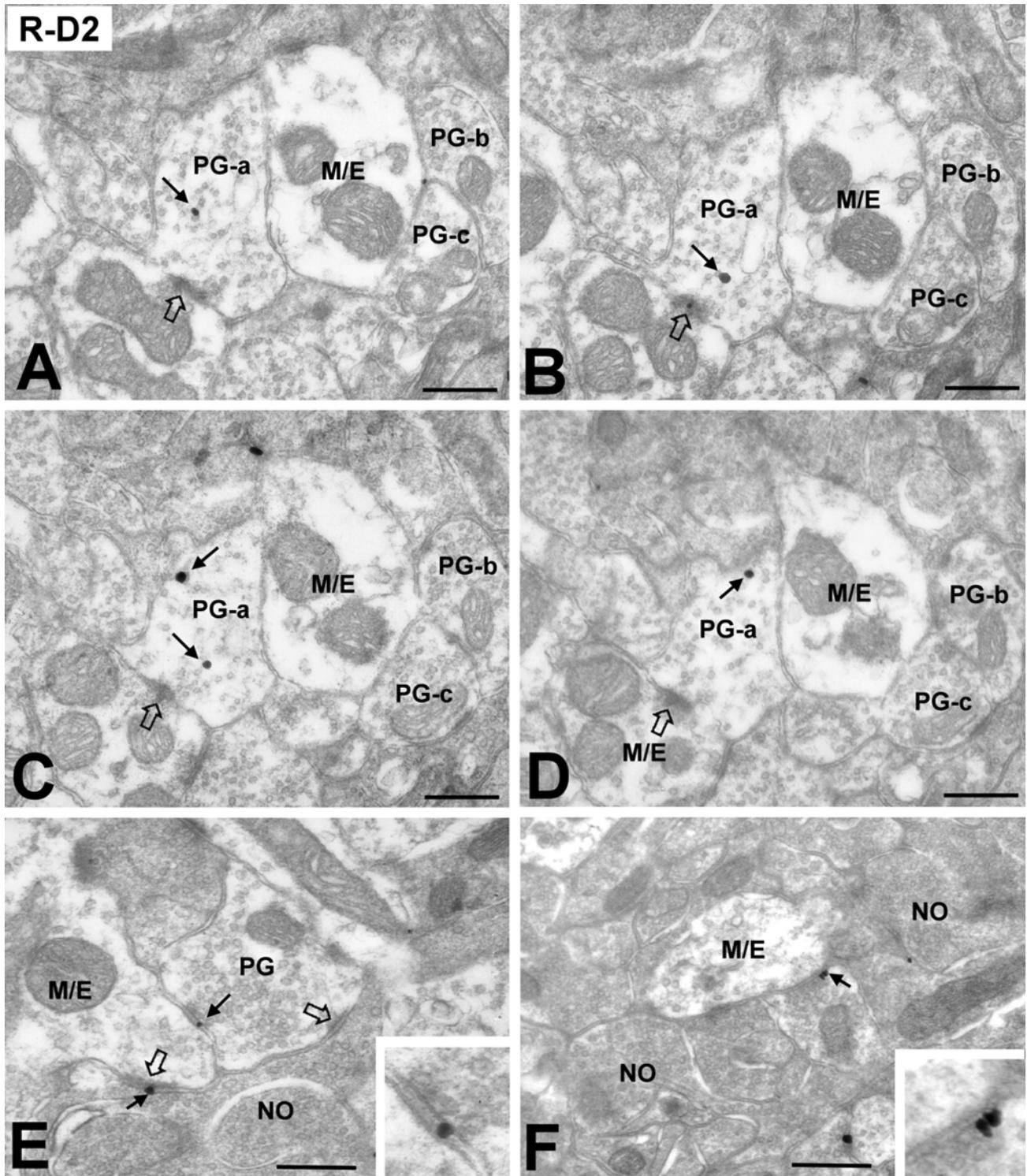


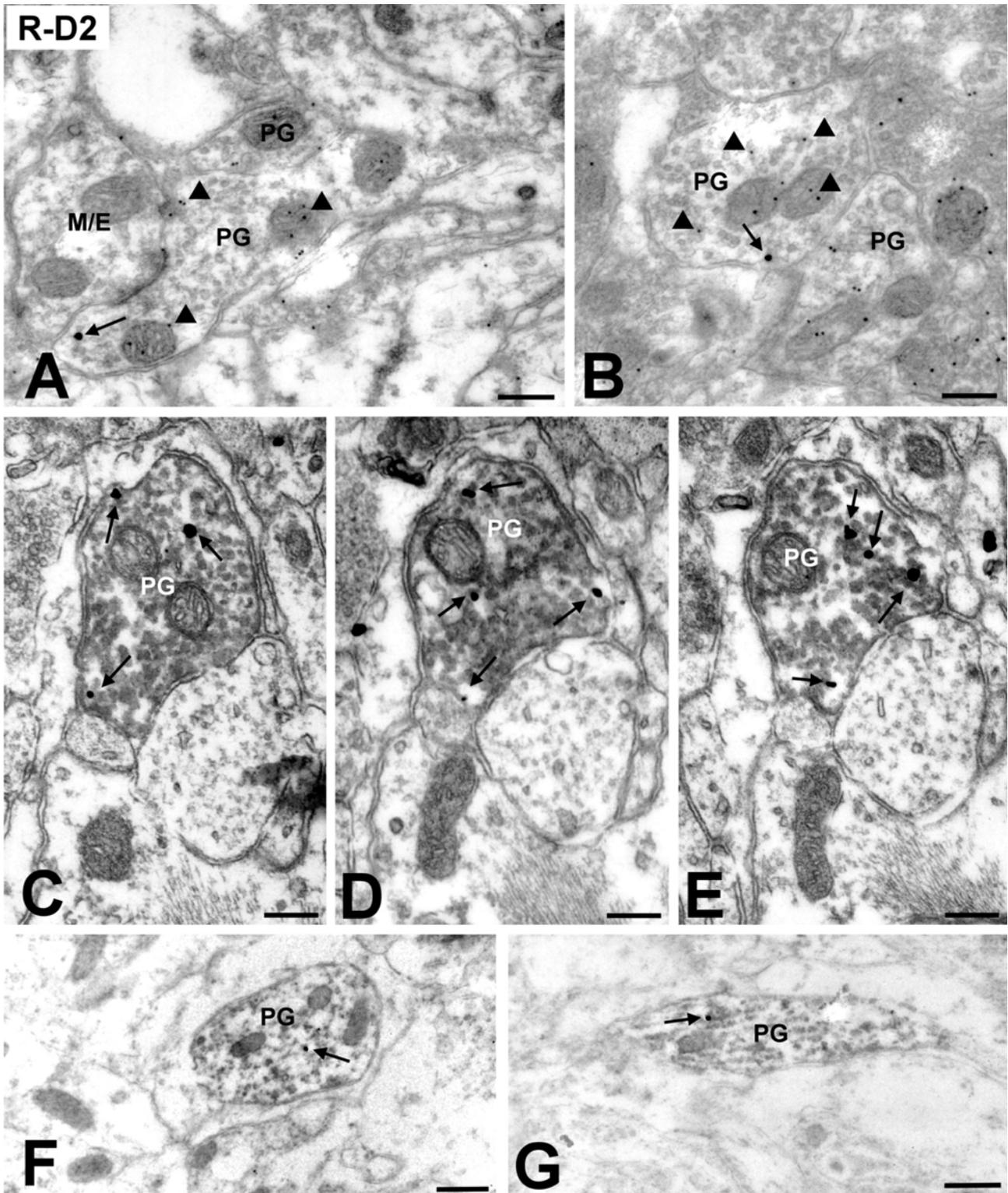
Figura 64. Caracterización de las células periglomerulares que contienen el receptor D2 de dopamina.

(A) y (B): Doble detección inmunocitoquímica del receptor D2 de dopamina, con partículas de oro coloidal en preinclusión (partículas de oro grandes; flechas), y de GABA, con partículas de oro coloidal en postinclusión (partículas de oro pequeño; cabezas de flecha). Se observan dos perfiles de células periglomerulares (PG) que expresan el receptor D2 de dopamina y son GABAérgicas.

(C), (D) y (E): Doble detección inmunocitoquímica del receptor D2 de dopamina, con partículas de oro coloidal en preinclusión (flechas), y de TH, con DAB en preinclusión. Se observa que el receptor D2 de dopamina aparece como autorreceptor en gémulas de células periglomerulares dopaminérgicas.

(F) y (G): Doble detección inmunocitoquímica del receptor D2 de dopamina, con partículas de oro coloidal en preinclusión (flechas), y de la enzima GCs, con DAB en preinclusión. Obsérvese que hay células periglomerulares que contienen GCs y receptor D2 de dopamina.

Barras de escala: (A,B,C,D,E) 250 nm; (F,G) 500 nm.



DISCUSIÓN

6.1. ANÁLISIS DE LAS VÍAS DE ACTUACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL BULBO OLFATORIO PRINCIPAL

El óxido nítrico es un gas que actúa como neuromensajero en el sistema nervioso central (Kiss y Vizi, 2001). En el bulbo olfatorio principal, el óxido nítrico producido por diferentes tipos de interneuronas (Scott y col., 1987; Croul-Ottman y Brunjes, 1988; Villalba y col., 1989; Davis, 1991; Vincent y Kimura, 1992; Alonso y col., 1993, 1995; Hopkins y col., 1996; Briñón y col., 1997) ha de tener alguna función importante en el proceso de la información olorosa, ya que en esta región se produce una importante cantidad de este gas (Bredt y col., 1991; Breer y Shepherd, 1993). A continuación se discutirán con detalle diferentes puntos relacionados con la acción del óxido nítrico en el bulbo olfatorio, tanto mediante la vía de la activación de la enzima GCs y la producción del segundo mensajero intracelular GMPc como mediante la vía de la nitrosilación de proteínas.

6.1.1. Distribución y localización de la nNOS en las interneuronas

Los primeros estudios realizados para detectar la actividad NADPH-diaforasa en el cerebro, así como estudios de distribución de la nNOS, bien mediante hibridaciones *in situ*, bien mediante técnicas inmunocitoquímicas, mostraron una distribución diferencial de las células encargadas de la producción de óxido nítrico. Además, se vio que el cerebelo y el bulbo olfatorio principal son las regiones del cerebro con más células productoras de óxido nítrico (Bredt y col., 1991; Vincent y Kimura, 1992; Breer y Shepherd, 1993). En el bulbo olfatorio algunas poblaciones de interneuronas son las responsables de la producción de este gas (Davis, 1991). En la capa de los glomérulos olfatorios, la nNOS se ha encontrado tanto en células superficiales de axón corto (Scott y col., 1987; Croul-Ottman y Brunjes, 1988; Villalba y col., 1989; Davis y col., 1991; Vincent y Kimura, 1992; Alonso y col., 1993; Hopkins y col., 1996; Briñón y col., 1997) como en algunas células periglomerulares (Davis, 1991). En la capa de las células granulares, algunas células profundas de axón corto y algunas células granulares también expresan nNOS (Scott y col., 1987; Villalba y col., 1989; Davis y col., 1991; Vincent y Kimura, 1992; Alonso y col., 1993, 1995; Briñón y col., 1997), sobre todo en la mitad inferior de la capa.

En la capa de los glomérulos olfatorios, las células periglomerulares con expresión de nNOS han sido recientemente clasificadas dentro de la categoría de PG1 (Crespo y col., 2003). Esta clasificación se basó en dos criterios principales. El primero es que las células periglomerulares nitrérgicas expresan GABA (Kraus y Prast, 2002; Crespo y col., 2003), considerada como una de las características comunes de todas las PG1 hasta hace poco tiempo (Gutiérrez-Mecinas y col., 2005). La segunda es que las células periglomerulares donde se expresa nNOS no expresan ni CB (Alonso y col., 1993) ni CR (Briñón y col., 1997), los dos marcadores neuroquímicos que expresan las PG2. Sin embargo, Crespo y col. (2003) no analizaron con detalle si las PG-nNOS distribuían sus ramificaciones dendríticas por el

compartimento sensorial, característica imprescindible para pertenecer a PG1 (Kosaka y col., 1987, 1997, 1998; Toida y col., 2000) y si estaban, por tanto, recibiendo contactos sinápticos desde el nervio olfatorio. En este estudio, hemos demostrado que las PG-nNOS, realmente, distribuyen sus dendritas por ambos compartimentos del neuropilo glomerular y que, además, reciben contactos sinápticos asimétricos desde los terminales axónicos del nervio olfatorio. Estos resultados permiten concluir que las células periglomerulares que contienen nNOS forman parte de las PG1, formando una subpoblación diferente de las PG1-TH, como ya habían descrito Crespo y col. (2003).

Se ha visto que la mayoría de veces, la producción de óxido nítrico en el sistema nervioso por parte de la nNOS está íntimamente relacionada con la actividad de los receptores de glutamato de tipo NMDA (Garthwaite y col., 1988; Bredt y Snyder, 1992; Aoki y col., 1997). En relación con esto, algunos autores han visto la existencia de colocación de estos receptores y de la nNOS en algunos tipos neuronales (Price y col., 1993; Zhang y Wong-Riley, 1996). El elemento que relaciona la producción de óxido nítrico con los canales de tipo NMDA es el Ca^{2+} (Garthwaite y Boulton, 1995). Cuando los receptores de glutamato de tipo NMDA se activan, se produce un influjo de Ca^{2+} que permite la formación del complejo Ca/CaM necesario para activar la nNOS (Collingridge y Lester, 1989; Garthwaite y Boulton, 1995; Aoki y col., 1997; Brenman y Bredt, 1997). Sin embargo, la coexpresión de nNOS en las células que contienen receptores de tipo NMDA no implica necesariamente que ambos elementos estén lo suficientemente cerca para que el Ca^{2+} que penetra en las células, cuya difusión es muy pequeña ($10^{-7}\text{cm}^2/\text{s}$), permita la activación de la nNOS (Aoki y col., 1997). Aunque la nNOS es una enzima citosólica y algunos autores la hayan localizado libre en el citosol (Aoki y col., 1997; nuestros datos), no sólo es común encontrarla en este estado, sino que también suele encontrarse próxima a membrana plasmática asociada a contactos sinápticos asimétricos, con una localización perisináptica o en la propia especialización postsináptica (Aoki y col., 1997). Que la nNOS se encuentre tan próxima a los contactos sinápticos es debido a la interacción de esta enzima con la proteína PSD95 que la ancla a los receptores de tipo NMDA (Brenman y col., 1996; Aoki y col., 1997; Esplugues, 2002). Sin embargo, aunque la nNOS se encuentre próxima a los receptores, no se producirá óxido nítrico si no hay una concentración de Ca^{2+} intracelular suficiente para que se ensamble el complejo Ca/CaM que active la nNOS (Aoki y col., 1997). En este estudio hemos analizado la localización subcelular específica de la nNOS en el interior celular utilizando para ello partículas de oro coloidal. En muchos de los perfiles analizados, hemos encontrado que la nNOS está próxima a la especialización postsináptica de los contactos glutamatérgicos que las PG1-nNOS reciben tanto del nervio olfatorio como de las células principales. Asumiendo que la activación de la nNOS está relacionada con la activación de los receptores de tipo NMDA (Bredt y Snyder, 1992; Garthwaite y col., 1998), y teniendo en cuenta que se ha demostrado la existencia de estos receptores en células periglomerulares que expresan nNOS (Zhang y Wong-Riley, 1996), podemos decir que, de igual forma que se ha visto en otras regiones cerebrales (Garthwaite y Boulton, 1995; Zhang y

Wong-Riley, 1996; Aoki y col., 1997; Brenman y Bredt, 1997), la producción de óxido nítrico por parte de las PG1-nNOS del bulbo olfatorio podría estar ligada a la activación de los receptores de glutamato de tipo NMDA cuando estas células periglomerulares reciben un contacto sináptico por parte del nervio olfatorio o de las células principales. El óxido nítrico producido difundirá libremente por el neuropilo glomerular hasta llegar a sus dianas de actuación donde ejercerá su función, como se discutirá a continuación.

6.1.2. Presencia de la enzima GCs en el bulbo olfatorio principal

En el cerebro, la activación de la GCs y la producción de GMPc es la manera en la que el óxido nítrico ejerce la mayoría de sus efectos fisiológicos de señalización celular (Krumenacker y col., 2004). Por tanto, discutiremos cuáles son las dianas de actuación para esta vía de señalización del óxido nítrico basándonos en los datos de expresión de la GCs.

6.1.2.1 *Presencia de la enzima GCs en la capa de los glomérulos olfatorios*

Teniendo en cuenta que el óxido nítrico es un gas que atraviesa las membranas lipídicas sin ninguna dificultad y sabiendo que puede difundir hasta unos pocos centenares de micras (Gally y col., 1990; Dawson y Snyder, 1994; Wood y Garthwaite, 1994; Lancaster, 1997; Krukoff, 1999; Contestabile, 2000; Kiss, 2000; Esplugues, 2002), es evidente que el gas puede difundir sin ningún problema desde las PG1-nNOS donde es producido hasta las células diana, aunque éstas estén distantes. El óxido nítrico producido por las células que contienen la enzima nNOS en los glomérulos olfatorios o en sus proximidades, principalmente las PG1-nNOS (Crespo y col., 2003), puede difundir por todo el neuropilo glomerular. Teniendo en cuenta la vida media del óxido nítrico, podría tener una función paracrina sobre todos los elementos que forman parte de la circuitería glomerular, incluyendo los terminales axónicos del nervio olfatorio, las dendritas de las células principales y las dendritas de las células periglomerulares. En este sentido, se ha hipotetizado que el óxido nítrico podría difundir hasta los terminales axónicos del nervio olfatorio activando la producción de GMPc y, en ese caso, estar influenciando la entrada de información sensorial (Breer y Shepherd, 1993). También se ha hipotetizado una acción directa del óxido nítrico sobre las células mitrales, atribuyéndole al óxido nítrico un papel en la formación de la memoria olfativa mediada por la activación de GCs y la consecuente producción de GMPc (Kendrick y col., 1997). Pese a estos estudios previos, nosotros no hemos encontrado inmunorreactividad para GCs ni en los terminales axónicos del nervio olfatorio, ni en las dendritas de las células principales. Por ello, concluimos que la acción del óxido nítrico en los glomérulos olfatorios mediada por la vía GCs/GMPc sólo ocurre sobre interneuronas y que estas interneuronas son, exclusivamente, células periglomerulares.

Es interesante mencionar que no todas las células periglomerulares son sensibles a la acción del óxido nítrico. Al contrario, nuestros datos muestran que la mayoría de estas interneuronas no responden al gas, al menos por la vía de actuación del GMPc. La no

colocalización de la GCs y la nNOS en ninguna célula periglomerular demuestra que el óxido nítrico no tiene un efecto autocrino sobre las PG1-nNOS que están produciéndolo. En este mismo sentido, la inexistencia de GCs en PG1-TH indica que las células periglomerulares dopaminérgicas no se ven afectadas por el óxido nítrico, al menos por esta vía de actuación del gas. La falta de GCs en PG1-TH no excluye otras posibles acciones del óxido nítrico en los circuitos dopaminérgicos, como será discutido con más detalle en el apartado 6.1.6. Las PG2-CR tampoco son las dianas de actuación del óxido nítrico. Nuestros datos demuestran claramente que sólo las PG2-CB, al contener la enzima GCs, son las dianas sobre las que el óxido nítrico ejerce su función en los glomérulos olfatorios vía producción de GMPc.

Las dendritas de las células periglomerulares que contienen GCs se encuentran restringidas al compartimento sináptico del neuropilo glomerular. Por el contrario, las PG1-nNOS envían sus dendritas hasta el compartimento sensorial donde reciben contactos sinápticos desde el nervio olfatorio. Si a esto le añadimos que hemos visto una estrecha asociación de la nNOS a la especialización postsináptica de las sinápsis que estas PG1-nNOS reciben desde el nervio olfatorio, podríamos decir que las PG1-nNOS estarían produciendo el óxido nítrico como respuesta a la recepción del input sensorial y que el óxido nítrico producido actuaría sobre las PG2-CB que, por el contrario, no reciben contactos desde el nervio olfatorio. Estas dos subpoblaciones de células periglomerulares serían capaces, por tanto, de responder a la entrada de input sensorial comunicándose entre ellas mediante un sistema de transmisión de información no sináptico. De manera que, existiendo una clara segregación en el neuropilo glomerular y presentando diferente conectividad, las PG1-nNOS y PG2-CB estarían íntimamente relacionadas a través de un mensajero como el óxido nítrico. En conjunto, estos datos refuerzan las descripciones anatómicas donde se describe una heterogeneidad neuroquímica de las células periglomerulares, demuestran una heterogeneidad funcional de estas interneuronas y, además, ponen en evidencia una nueva relación entre la transmisión sináptica y no sináptica en el bulbo olfatorio (Esquema 1).

6.1.2.2 ***Presencia de la enzima GCs en la región inframitral***

En la región inframitral, al igual que en la capa de los glomérulos olfatorios, existe una subpoblación de células que produce óxido nítrico (Davis, 1991) y otra subpoblación que está respondiendo al gas mediante la activación de la GCs y la producción del segundo mensajero GMPc. Ambas, han sido identificadas como células profundas de axón corto.

Las células profundas de axón corto constituyen una heterogénea población de células que agrupa a todas las interneuronas diferentes de las células granulares, aunque estas células presenten características morfológicas y neuroquímicas distintas unas de otras (Schneider y Macrides, 1978; López-Mascaraque y col., 1986; Kakuta y col., 1998; Alonso y col., 2001). Entre ellas, nosotros hemos demostrado que la GCs se expresa en todas las células horizontales y en poco más de la mitad de las células verticales de Cajal donde además se expresa CB. Mucho

más heterogénea es su presencia en interneuronas situadas en zonas más profundas de la capa como son las células de Blanes o las células de Golgi. Hemos visto que la GCs está, por ejemplo, en algunas células profundas de axón corto que presentan PV y en otras donde se expresa la nNOS.

A pesar de la heterogeneidad morfológica y neuroquímica de las células profundas de axón corto, desde que se describieron se ha asumido que estas interneuronas inervan de forma homogénea a las células granulares (Schneider y Macrides, 1978; Gall y col., 1986). Sin embargo, hace unos pocos años, Gracia-Llanes y col. (2003) demostraron que, al menos, una subpoblación de células profundas de axón corto, las que expresan VIP, no inervan a las células granulares, sino que inervan, de forma específica, a otras subpoblaciones específicas de células profundas de axón corto (en concreto a las que expresan CB, VIP y NPY), demostrando un mayor grado de complejidad en la circuitería del bulbo olfatorio que el que hasta entonces se conocía. Los datos que hemos obtenido en nuestro estudio, con la presencia de la GCs en diferentes subpoblaciones morfológicas y neuroquímicas de células profundas de axón corto, añaden un nuevo nivel de modulación en los circuitos locales en los que estas interneuronas están integradas. Por ejemplo, si tenemos en cuenta todos estos datos, podemos decir que la modulación ejercida sobre las células horizontales y las células verticales de Cajal se ejerce desde los circuitos locales del propio bulbo, al menos, de dos formas distintas. Por un lado, estas células estarían moduladas mediante mecanismos sinápticos desde las células profundas de axón corto que expresan VIP (Gracia-Llanes y col., 2003). Por otro lado, estarían siendo moduladas por mecanismos no sinápticos desde las células profundas de axón corto que sintetizan óxido nítrico. Las células profundas de axón corto que contienen GCs y expresan PV, por el contrario, según los datos que existen hasta el momento, sólo estarían siendo modificadas por mecanismos no sinápticos desde las células profundas de axón corto que sintetizan óxido nítrico. Por último, aunque por regla general en el cerebro las células que producen óxido nítrico no presentan GCs, existen algunas excepciones, como las fibras del fascículo longitudinal medial, la habénula lateral y unas pocas células de la habénula medial (de Vente y col., 1998) donde nNOS y GCs se coexpresan. Nosotros demostramos que en la capa de las células granulares del bulbo olfatorio existe otra excepción. La GCs presente en estas interneuronas, que además producen óxido nítrico, podría mediar una función autocrina del gas.

6.1.2.3. **Relación existente entre óxido nítrico, GCs y CB**

Como vemos en los resultados, casi la totalidad de células periglomerulares que contienen GCs expresan CB. Hemos visto, además, que una gran mayoría de las células profundas de axón corto que contienen GCs también expresan CB, en concreto todas las células identificadas como células horizontales y células verticales de Cajal.

Como venimos indicando en esta tesis, el óxido nítrico puede actuar directamente sobre algunas proteínas nitrosilándolas o formando cuerpos S-nitrosos (Pietraforte y col., 1995). Se

piensa que estos cuerpos S-nitrosos facilitan el transporte del óxido nítrico, prolongando su vida, o bien sirven para mitigar su potencial citotóxico en los organismos (Stamler y col., 1992). Para que el óxido nítrico nitrosile una proteína, el residuo L-Cys que es nitrosilado ha de tener a su alrededor una secuencia de aminoácidos específica, formando una “región consenso” (Stamler y col., 1997; Xu y col., 1998; Lipton, 1999; Sun y col., 2001; Haendeler y col., 2002). Se ha visto que la CB tiene en su estructura 5 residuos L-Cys, dos de los cuales son susceptibles de ser S-nitrosilados por cumplir el requisito de estar integrados en “regiones consenso”. Recientemente, Tao y col. (2002) han demostrado con ensayos bioquímicos que estos dos residuos L-Cys son muy fácilmente nitrosilados. Estos autores, además, proponen en su artículo una relación funcional del óxido nítrico y la proteína ligante de Ca^{2+} . Para ellos, la CB podría actuar como un sistema de tamponamiento del óxido nítrico en las células que la expresan. El hecho de que nosotros hayamos encontrado GCs en las células que expresan CB puede estar relacionado con la hipótesis de Tao y col. (2002) y puede tener un significado funcional muy importante que interrelacione la vía de actuación del óxido nítrico mediada por GMPc y la de la nitrosilación de proteínas, tal y como argumentamos a continuación.

Se ha demostrado que para que se produzca S-nitrosilación de proteínas se requiere una concentración de óxido nítrico muy superior a la necesaria para activar la GCs (Ahern y col., 2002). Nosotros proponemos que en las células donde existe una coexpresión de GCs y CB podría ocurrir lo siguiente: en condiciones fisiológicas, cuando el óxido nítrico producido por las células nNOS-positivas difundiera hasta llegar a las células que coexpresan GCs y CB, el gas activaría en primer lugar a la GCs, que responderá produciendo GMPc; pero si continuara la llegada de óxido nítrico a estas células, por ejemplo porque en condiciones extrafisiológicas se produjera óxido nítrico en niveles muy altos y la GCs se encontrara saturada, se produciría la unión del gas a la CB, que actuará como elemento tamponador o de reservorio, como sugieren Tao y col. (2002). También podría pasar que, en estas células, el proceso de S-nitrosilación de la CB fuese previo a la activación de la GCs y sólo en el caso de que la CB no pudiera seguir acumulando óxido nítrico, se activaría la enzima produciendo GMPc. Tenemos que decir que en condiciones normales, nosotros no hemos detectado presencia de ninguna proteína S-nitrosilada en las células periglomerulares (ni en ningún otro tipo celular) del bulbo olfatorio principal. Por ello, proponemos que, de ser cierta la hipótesis de Tao y col. (2002), la actuación del óxido nítrico en condiciones fisiológicas estaría mediada en estas células por la GCs y sólo en condiciones excepcionales se produciría la nitrosilación de la CB como respuesta a concentraciones no fisiológicas del gas (Esquema 2).

6.1.3. Vías de señalización intracelular del GMPc en las células que expresan GCs

El GMPc producido tras la activación de la GCs por la unión del óxido nítrico puede tener muchos efectos distintos en las células (Denninger y Marletta, 1999; Mateo y Artiñano, 2000;

Friebe y Koesling, 2003; Krumenacker y col., 2004; Murad, 2004; Bicker, 2005). La mayoría de estos efectos los ejerce por tres vías de señalización intracelular distintas: vía de la activación de los CNG (Kaupp, 1995; Zimmerman, 1995; Biel y col., 1999), vía de la activación de las PKG (Francis y Corbin, 1991; Butt y col., 1993; Lohmann y col., 1997; Hofmann y col., 2000) y vía de la activación de las PDE (Beavo, 1995; Juilfs y col., 1999; Francis y col., 2000). En los siguientes apartados discutiremos cuál o cuáles de estas tres vías podrían mediar los efectos del óxido nítrico en las interneuronas del bulbo olfatorio que tienen GCs (Esquema 3).

6.1.3.1. **Vías de señalización del GMPc en las células periglomerulares que expresan GCs**

Existen datos en la literatura en los que se describe la presencia de CNG (El Husseini y col., 1995), HCN (Notomi y Shigemoto, 2004), PKG (El-Husseini y col., 1995; Lohmann y col., 1997; Feil y col., 2005) y PDE (Kotera y col., 1997; Van Staveren y col., 2003) en el bulbo olfatorio principal de los mamíferos. Dentro de la familia de los CNG, se ha descrito la expresión de las subunidades CNGA2 y CNGA3 en la capa de los glomérulos olfatorios (Kingston y col., 1999; Strijbos y col., 1999) aunque sin mención explícita a su posible expresión en las células periglomerulares. En nuestros resultados, no vemos que las células periglomerulares que contienen GCs presenten CNGA2 y sólo unas pocas expresan CNGA3, de manera que podemos concluir que la vía de señalización intracelular del óxido nítrico no está mediada, al menos mayoritariamente, por CNG en cuya composición participen estas subunidades.

En el trabajo de Kingston y col. (1999), se describe la presencia de CNGA2 en células juxtaglomerulares, pero sin hacer mención a ningún tipo morfológico en particular; en nuestro trabajo, vemos que CNGA2 aparece principalmente en astrocitos, aunque también lo vemos en algunas células juxtaglomerulares que tienen morfología de células periglomerulares. Estas células, sin embargo, no presentan GCs como demuestran nuestros experimentos de colocalización. Por otro lado, la distribución de CNGA3 ha sido descrita con técnicas de hibridación *in situ* en la capa glomerular, aunque sin dar detalles de los tipos celulares en los que se expresa (Strijbos y col., 1999). En nuestros resultados, vemos que CNGA3 se expresa, como decían estos autores, en la capa de los glomérulos olfatorios, tanto en células empenachadas externas como en algunas células periglomerulares. Sin embargo, los estudios de colocalización con GCs demuestran que sólo una mínima parte de las células periglomerulares que expresan GCs contienen esta subunidad (5%).

En relación con los CNG, también hay que decir que en un artículo muy reciente (Tetreault y col., 2006) se describe una nueva subunidad, que estos autores han denominado CNGA5. Esta nueva subunidad se encuentra ampliamente distribuida por todo el cerebro y presenta más de un 70% de homología con la subunidad CNGA2. Teniendo en cuenta estos datos, es posible que en su trabajo de 1999, Kingston y col., al detectar mediante hibridación *in situ* la subunidad CNGA2, estuvieran detectando también CNGA5, ya que la sonda podría reconocer la parte que ambas subunidades tienen en común. Sería posible, en ese caso, que parte de las células

juxtaglomerulares que estos autores describen con CNGA2 correspondan a células que contengan CNGA5. No podemos descartar que las células periglomerulares que expresan GCs contengan CNGA5 o incluso otras subunidades de los CNG, como CNGA1, cuya expresión no hemos podido analizar en nuestro estudio por carecer de anticuerpos específicos que garantizaran la fiabilidad de los resultados. De todos modos, respecto a CNGA1, no parece probable su implicación en la vía de señalización del óxido nítrico en el bulbo olfatorio principal, si se tiene en cuenta que los datos de Bradley y col. (1997) indican que esta subunidad no se expresa fuera de la retina. Por el contrario, la subunidad CNGA5 parece una excelente candidata para la transducción de la señalización por óxido nítrico si se atiende a la amplia distribución que tiene por todo el cerebro (Tetreault y col., 2006). Desafortunadamente, no hemos podido conseguir anticuerpos frente a esta subunidad que nos permitieran detectar su expresión en el bulbo olfatorio. Por lo tanto, no podemos asegurar ni descartar la participación de CNGA5 en esta vía de señalización.

Descartada la participación de CNGA2 y CNGA3 en la vía, hemos analizado si las células periglomerulares que expresan GCs presentan HCN que pudieran responder al GMPc, ya que había sido descrita con anterioridad la presencia de las subunidades HCN1 (Holderith y col., 2003; Notomi y Shigemoto, 2004), HCN2 y HCN4 (Notomi y Shigemoto, 2004) en la capa de los glomérulos olfatorios del bulbo olfatorio de la rata. El estudio de la distribución de HCN1 en esta capa fue realizado por Holderith y col. (2003); estos autores vieron expresión de HCN1 principalmente en células periglomerulares GABAérgicas y no dopaminérgicas. También vieron, sin embargo, que aproximadamente el 6% de las células donde se encontraba esta subunidad eran PG2-CB. En nuestro estudio vemos, además, que tanto HCN2 como HCN4 se expresan en células periglomerulares, pero no vimos, en ningún caso, la presencia de estos canales en células periglomerulares con GCs. Por tanto, podemos concluir que la vía de señalización del óxido nítrico por activación de la GCs y producción de GMPc no utiliza, como regla general, los HCN.

Otra posible vía de transducción intracelular del GMPc son las PKG. Dado que existen dos PKG diferentes y que ambas se expresan en el bulbo olfatorio principal como demuestran algunos datos previos (El-Husseini y col., 1995; Lohmann y col., 1997; Feil y col., 2005), se estudió su posible presencia en las células periglomerulares que expresan GCs. Los resultados obtenidos muestran que PKG1 β está presente en una abundante población de células periglomerulares, pero en ningún caso la vimos en la subpoblación que expresa GCs. También se estudió la distribución de PKG2 en la capa de los glomérulos olfatorios. Como describimos en el apartado de resultados, no vemos que PKG2 se exprese en las células periglomerulares que contienen GCs, sólo la encontramos en procesos de células gliales, datos que están de acuerdo con otros trabajos previos donde describen su expresión en oligodendrocitos y astrocitos (de Vente y col., 2001). No se realizó el análisis de distribución de PKG1 α , ya que en estudios previos no se había visto su presencia en el bulbo olfatorio de la rata (Feil y col., 2005). De

todos estos datos, podemos concluir que la vía de señalización por óxido nítrico en los glomérulos olfatorios no está mediada por las PKG.

Por último, el GMPc también puede activar PDE, cuya función sería degradar los nucleótidos monofosfato cíclicos a nucleótidos monofostato. Existen PDE específicas para GMPc entre las que nos encontramos con la PDE5 (Thomas y col., 1990a,b; Kotera y col., 1997; Loughney y col., 1998), la PDE9 (Fisher y col., 1998; Guipponi y col., 1998; Soderling y col., 1998) y la PDE6 (Gillespie y Beavo, 1988); otras PDE reconocen tanto GMPc como AMPc, como son la PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 y PDE11 (Corbin y Francis, 1999; Dousa, 1999; Juilfs y col., 1999; Soderling y Beavo, 2000). En este estudio, hemos analizado la presencia de PDE5 en las células periglomerulares que expresan GCs por razones diferentes. En primer lugar, PDE5 es altamente específica para GMPc (Thomas y col., 1990a,b; Kotera y col., 1997; Loughney y col., 1998; Fink y col., 1999). En segundo lugar, se ha visto la presencia de PDE5 en el bulbo olfatorio y, dado que su distribución en el cerebro está muy restringida, algunos autores sugieren que pueda estar implicada en vías de señalización muy específicas (Van Staveren y col., 2003).

Nosotros hemos visto la presencia de PDE5 en la capa de los glomérulos olfatorios, tanto en células principales como en células periglomerulares que expresan GCs. Debido al método que hemos tenido que utilizar para detección de colocación de PDE5 y GCs (doble marcaje inmunocitoquímico en preinclusión para microscopía electrónica, detectando la GCs con DAB y la PDE5 con partículas de oro coloidal) ha sido prácticamente imposible realizar una cuantificación detallada del porcentaje de células que coexpresan GCs y PDE5. Puesto que la PDE5 se activa por GMPc y esta enzima a su vez hidroliza GMPc, su presencia en las células con GCs podría estar indicando un mecanismo de retroalimentación negativa en estas células para controlar así los niveles intracelulares del GMPc. El control de la concentración intracelular de GMPc es muy importante en las células, incluso a nivel subcelular, pudiéndose crear dentro de las células "microdominios" locales con concentraciones altas del nucleótido cíclico y otros con concentraciones bajas (Menniti y col., 2007).

Tanto al óxido nítrico como al GMPc se les han atribuido papeles importantes en los procesos de aprendizaje y memoria (Ohno y col., 1993; Fin y col., 1995; Bernabeu y col., 1996; Qiang y col., 1997, 1999; Blokland y col., 1998; Ingram y col., 1998b). La asignación de estos papeles se ha visto confirmada con distintos experimentos en los que utilizando inhibidores de NOS se dañaba de forma considerable el proceso de aprendizaje y memoria (Chapman y col., 1992; Böhme y col., 1993; Estall y col., 1993; Mogensen y col., 1995; Yamada y col., 1995; Hölscher y col., 1996; Kendrick y col., 1997; Noda y col., 1997; Prendergast y col., 1997; Pitsikas y col., 2002; Khavandgar y col., 2003). Cuando la NOS es inhibida no se produce GMPc en las células diana del óxido nítrico. Parece ser que son los elevados niveles de GMPc los que posibilitan los procesos de aprendizaje y memoria, y su caída lo que imposibilita dichos procesos en los modelos experimentales donde se induce la inhibición de la nNOS. Una enzima

que ha de estar implicada en la modulación fina de los niveles intracelulares de GMPc es la PDE5, convirtiéndose en una herramienta útil para modificar los procesos de aprendizaje y memoria (Prickaerts y col., 1997). De hecho, algunos estudios han demostrado que inhibidores específicos de la PDE5, como el sildenafil o el vardenafil, mejoran los procesos de memoria de los animales tratados (Prickaerts y col., 1997, 2004). Nosotros hemos encontrado la presencia de PDE5 en células periglomerulares, además de en células principales; teniendo en cuenta que los glomérulos olfatorios son el primer punto de relevo de la información olorosa del bulbo olfatorio (Shiple y Ennis, 1996; Shepherd y Greer, 1998), es posible que, de alguna manera, la PDE5 encontrada en los circuitos de los glomérulos participe en procesos de aprendizaje y adquisición de memoria olfativa que puedan estar produciéndose a este nivel.

Por último, tampoco podemos descartar la implicación de otras PDE que se activen por GMPc. Entre ellas, tiene especial interés la PDE2 que se activa por GMPc e hidroliza AMPc, o la PDE3 que se inhibe por GMPc y también hidroliza AMPc de forma específica (Menniti y col., 2006). No hemos podido estudiar la implicación de estas dos PDE por no disponer de ningún anticuerpo específico para su detección que nos ofreciera garantías de la especificidad de los resultados.

6.1.3.2. *Vía de señalización del GMPc en las células profundas de axón corto*

Como ya se ha discutido en resultados y brevemente en el apartado 6.1.2.2., las células que presentan GCs en la capa de las células granulares pertenecen a distintos tipos de interneuronas englobadas dentro de la categoría de células profundas de axón corto. Como vemos en nuestros resultados, las células profundas de axón corto que presentan GCs pertenecen a subpoblaciones que expresan distintos marcadores neuroquímicos: CB, nNOS y PV. Hemos analizado la presencia de distintas subunidades de CNG (CNGA2 y CNGA3) y de HCN (HCN1, HCN2 y HCN4), de las distintas PKG y de PDE5 en los dos tipos celulares que coexpresan GCs y CB (células horizontales y células verticales de Cajal) y no hemos visto que ninguno de los efectores del GMPc analizados estuviera presente en estos tipos celulares. No se descarta, sin embargo, que en estas células estén presentes otras vías de transducción utilizadas por el GMPc y que no se hayan podido estudiar en este trabajo (como son cualquiera de las otras PDE que reconocen GMPc o las subunidades de CNGA1 y CNGA5 de los CNG).

Algunas de las células profundas de axón corto que expresan GCs y no tienen CB, presentan PV y nNOS. Hemos visto que, de todos los marcadores para las distintas vías de señalización intracelular del GMPc analizadas en este estudio, las células que contienen nNOS presentan tanto CNGA2 como HCN4. Por tanto, el efecto autocrino del óxido nítrico podría estar mediado por diferentes CNG.

6.1.4. Análisis de las distintas vías de transducción del GMPc

6.1.4.1. *Distribución general de los CNG*

6.1.4.1.1. *Distribución general de CNGA2*

Estudios previos donde se estudia la distribución de CNGA2 en el bulbo olfatorio han descrito que esta subunidad está presente en células juxtaglomerulares, en células empenachadas, en células mitrales y en células granulares (El-Husseini y col., 1995; Kingston y col., 1996, 1999; Bradley y col., 1997). Estos autores, sin embargo, no hacen mención a su presencia en astrocitos. En este trabajo, nosotros hemos visto la presencia de CNGA2 en algunas células juxtaglomerulares, en células empenachadas, en células mitrales, en algunas células profundas de axón corto y en astrocitos. De todas ellas, las células que mayor inmunorreactividad para CNGA2 presentan son, con diferencia, los astrocitos. Una diferencia importante entre nuestro trabajo y los trabajos previos ha sido el método de detección; mientras todos los trabajos realizados previamente utilizan hibridaciones *in situ* (El-Husseini y col., 1995; Kingston y col., 1996, 1999; Bradley y col., 1997), nosotros hemos utilizado técnicas inmunocitoquímicas, que sin duda son métodos más eficientes para detectar la expresión de una proteína y que proporcionan una mayor información morfológica de los elementos positivos permitiendo su identificación y posterior caracterización. Esta podría ser la causa en la discrepancia de resultados obtenidos respecto a las células gliales.

Aparte de la activación de la GCs, existen otras vías de producción de GMPc en el interior celular. Una de estas vías es la de la unión de péptidos natriuréticos al dominio extracelular de la guanilato ciclasa particulada, activándola y desencadenando la síntesis del GMPc (Baltrons y col., 1997). Distintos estudios han demostrado la presencia de guanilato ciclasa particulada tanto en las células principales del bulbo olfatorio (Herman y col., 1996) como en astrocitos (de Vente y col., 1989; Sumners y Tang, 1992; de Vente y Steinbusch, 2000). En este sentido, la expresión de CNGA2 en células principales y en astrocitos del bulbo olfatorio, podría estar relacionada con esta vía de señalización en lugar de estarlo con la vía de señalización del óxido nítrico. La activación de CNG causa un influjo significativo de Ca^{2+} hacia el interior celular (Gray-Keller y Detwiler, 1994) y, en las células principales, este Ca^{2+} podría modificar la liberación de neurotransmisores a nivel presináptico (Rieke y Schwartz, 1994; Zuffall y col., 1997). En los astrocitos se ha visto que un aumento en los niveles de Ca^{2+} está relacionado con la liberación de gliotransmisores que afectan a la actividad de las neuronas adyacentes (Parpura y col., 1994; Wang y col., 2000; Coco y col., 2003; Newman, 2003) y con la liberación de compuestos vasoactivos que regulan el sistema vascular cerebral (Zonta y col., 2003). Además de participar en estas funciones, el GMPc producido en los astrocitos puede tener un papel importante durante el desarrollo o en procesos de neuroprotección (Wiggins y col., 2003). Algunas de estas funciones podrían estar mediadas por CNG en cuya composición participara la subunidad CNGA2.

6.1.4.1.2. *Distribución general de CNGA3*

CNGA3 tiene una amplia distribución en el bulbo olfatorio, sugiriendo que los CNG formados por esta subunidad son piezas clave en la función de esta región cerebral. Los distintos tipos celulares que expresan CNGA3, incluyendo neuronas maduras, células inmaduras en proceso de migración radial y un tipo específico de células gliales (la glía envolvente del nervio olfatorio), sugieren distintas funciones en las que CNGA3 podría estar implicado.

Todos los CNG responden de igual forma tanto a AMPc como a GMPc. Es bien sabido que la transducción de la información olorosa en las neuronas receptoras de los olores implica la señalización por AMPc y que las subunidades que integran el canal responsables de esta transducción son CNGA2, CNGA4 y CNGB1 (Nakamura y Gold, 1987; Bradley y col., 2005; Pifferi y col., 2006). También se ha demostrado que estos canales no discriminan entre AMPc y GMPc. Por el contrario, la transducción de la información visual en los conos está mediada por GMPc a través de las subunidades CNGA3 y CNGB3; estos canales, por su parte, sí que discriminan entre GMPc y AMPc. Además, hay un reducido grupo de neuronas en el epitelio olfatorio de la rata que no utiliza AMPc para la transducción sensorial, sino GMPc; estas neuronas receptoras de los olores no expresan CNGA2 en su cilio apical, sino CNGA3 (Meyer y col., 2000). Tomando todos estos datos en conjunto, podemos apreciar que el CNGA3 puede ser considerado como una subunidad específica para GMPc y, por tanto, su amplia distribución en la circuitería del bulbo olfatorio sugiere que la señalización por GMPc tiene un papel fundamental en el procesamiento de la información sensorial.

6.1.4.1.2.1. Expresión de CNGA3 en glía envolvente

Un dato muy interesante de nuestro trabajo es la presencia de CNGA3 en la glía envolvente. La glía envolvente del sistema olfatorio constituye un tipo de glía que comparte algunas características comunes con los astrocitos y con las células de Schwann, aunque tienen distinto origen y muestran características estructurales peculiares (Ramón-Cueto y Ávila, 1998). Estas células envuelven los axones olfatorios evitando que contacten con otras células gliales; además, se sabe que estas células son las responsables de la capacidad del crecimiento axonal y la regeneración funcional que tienen las células receptoras de los olores. Por esta razón, se ha prestado especial atención a la biología celular y molecular de la glía envolvente (Chuah y West, 2002). Numerosos estudios han analizado el patrón fenotípico de estas células con el propósito de obtener marcadores químicos específicos para identificarlas tanto *in vivo* como *in vitro* (Ramón-Cueto y Ávila, 1998; Chuah y West, 2002). La conclusión a la que llegaron estos estudios es que la glía envolvente comparte marcadores inmunocitoquímicos con otros tipos de glía. En nuestro estudio demostramos que la glía envolvente muestra una elevada inmunorreactividad para CNGA3. Ya que no hemos encontrado

inmunorreactividad para CNGA3 en astrocitos ni en oligodendrocitos, CNGA3 podría ser una herramienta muy útil para identificar químicamente este tipo de glía. Sin embargo, deben realizarse estudios más detallados utilizando CNGA3 y otros marcadores específicos para astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann y microglía para determinar si la expresión de CNGA3 es una característica específica de la glía envolvente o si es una característica química compartida con otros tipos de glía.

La glía envolvente muestra una concentración elevada y variable de Ca^{2+} intracelular en condiciones de reposo (Hayat y col., 2003a). La homeostasis del Ca^{2+} es decisiva para el correcto funcionamiento de estas células. En este sentido, la efectividad de las células que conforman la glía envolvente en su función de facilitar la regeneración axonal depende de su concentración intracelular de Ca^{2+} (Hayat y col., 2003a,b). En estos trabajos, estos autores anticiparon que las células que conforman la glía envolvente deberían tener un influjo de Ca^{2+} mediado por canales catiónicos no dependientes de voltaje que estarían activados de forma tónica induciendo a un incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} ; sin embargo, Hayat y col. (2003a,b) no identificaron estos canales. Nuestros resultados, por tanto, proporcionan una base anatómica y molecular para explicar los datos de Hayat y col. (2003 a,b): por un lado, los CNG son canales catiónicos no dependientes de voltaje; por otro lado, los CNG son permeables para cationes divalentes, en particular para el Ca^{2+} , proporcionando una vía efectiva para la entrada de este catión en la célula. Nosotros hipotetizamos que los canales que tienen esta subunidad permiten la entrada de Ca^{2+} en las células de la glía envolvente, permitiendo el correcto funcionamiento de este tipo de glía. Estos resultados podrían constituir una base para investigar la maquinaria celular que permite la guía y el crecimiento axonal por parte de la glía envolvente.

6.1.4.1.2.2. Expresión de CNGA3 en neuronas maduras

Se ha demostrado que tanto el AMPc como el GMPc pueden facilitar la transmisión sináptica entre las fibras del nervio olfatorio y sus dianas en los glomérulos olfatorios (Murphy e Isaacson, 2003). Utilizando mediciones electrofisiológicas, estos autores concluyeron que este papel está mediado por CNG situados presinápticamente en los terminales axónicos del nervio olfatorio: los CNG podrían aumentar la concentración de Ca^{2+} en los botones sinápticos induciendo al incremento en la liberación del transmisor. Nosotros no hemos encontrado inmunorreactividad para CNGA3 en el nervio olfatorio. Además, hemos analizado los terminales sinápticos de los axones olfatorios en el compartimento sensorial del neuropilo glomerular y eran claramente CNGA3-inmunonegativos. Por tanto, estos datos demuestran que las subunidades CNGA3 no está implicadas en los efectos presinápticos descritos por Murphy e Isaacson (2003).

La población más abundante de células inmunorreactivas para CNGA3 encontrada en el bulbo olfatorio la forman las células principales. Además, también hemos encontrado CNGA3 en dos poblaciones de interneuronas GABAérgicas. Nuestro grupo no es el primero en mostrar la expresión de CNGA3 fuera de los conos de la retina. En un trabajo previo, utilizando técnicas de hibridación *in situ*, se describe la presencia de RNAm de CNGA3 en células del córtex visual de la rata (Samanta Roy y Barnstable, 1999), aunque no se sabe qué función cumple en estas células. De igual forma, nosotros no sabemos qué papel puede tener CNGA3 en las neuronas del bulbo olfatorio. Se ha demostrado que el GMPc puede modificar las sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas de la corteza en los terminales presinápticos, pero este papel se ha visto que está mediado por PKG en lugar de por CNG (Barnstable y col., 2004). Nosotros hemos encontrado CNGA3 a nivel presináptico, tanto en células principales como en interneuronas y, por tanto, no podemos descartar un funcionamiento en el elemento presináptico en ambos tipos celulares de la circuitería.

Se ha sugerido que la actividad de los CNG en las neuronas ha de estar acoplada a la señalización por óxido nítrico. Además, la correlación entre la expresión de CNG y los elementos que participan en la señalización por óxido nítrico en determinadas neuronas ha llevado a algunos autores a proponer que los CNG han de estar entre uno de los mayores efectores del sistema de señalización por óxido nítrico (Barnstable y col., 2004). El bulbo olfatorio es una de las regiones del cerebro con mayor producción del óxido nítrico (Bredt y col., 1991; Vincent y Kumura, 1992). Sin embargo, nuestros resultados indican que CNGA3 no está relacionado con el sistema de señalización por óxido nítrico en la circuitería del bulbo olfatorio de la rata. Dos hechos refuerzan esta afirmación. Primero, está ampliamente aceptado que en condiciones fisiológicas el óxido nítrico activa la GCs. Las células principales del bulbo olfatorio son las células que, con diferencia, mayor cantidad de CNGA3 presentan, pero como hemos visto anteriormente, ninguna célula principal expresa GCs y, por tanto, no pueden responder al óxido nítrico produciendo GMPc. Segundo, la población más abundante en el bulbo olfatorio que expresa GCs son las PG2-CB; sin embargo, hemos visto que sólo el 5% de estas células periglomerulares expresa CNGA3. Por tanto, el origen del GMPc en las células que expresan CNGA3 no ha de ser el sistema de señalización de óxido nítrico. Nosotros proponemos que la expresión de CNGA3 en las neuronas del bulbo olfatorio podría estar relacionada con el sistema de señalización de los péptidos natriuréticos. Los péptidos natriuréticos activarían a la guanilato ciclasa particulada que se ha visto que está presente en las células principales del bulbo olfatorio (Herman y col., 1996) y ésta produciría GMPc que podría actuar a través de los CNGA3.

6.1.4.1.3. *Distribución general de los HCN*

Las tres subunidades de los HCN que hemos analizado en nuestro estudio, tienen un patrón de distribución muy similar en los elementos de la circuitería del bulbo olfatorio, aunque cuando se observan a microscopía óptica los patrones de distribución de cada una de ellas en principio parezcan muy diferentes. Lo primero que tienen en común es que tanto HCN1, como HCN2 y HCN4 se expresan en células periglomerulares GABAérgicas. Además, estas tres subunidades también se expresan conjuntamente en células principales. Sin embargo, hemos visto que en las interneuronas GABAérgicas de la capa plexiforme externa sólo estaban presentes las subunidades HCN1 y HCN2, mientras que en las células granulares sólo hemos visto las subunidades HCN1 y HCN4.

Los HCN funcionales están formados por la unión de cuatro subunidades, que normalmente forman heterotetrámeros (Ludwig y col., 1998; Santoro y col., 1998; Moosmang y col., 1999; Franz y col., 2000; Biel y col., 2002). A este respecto, nuestros resultados parecen indicar que en las células principales y en las células periglomerulares los canales funcionales estén formados por combinaciones de HCN1, HCN2 y HCN4, mientras que en los canales de las interneuronas GABAérgicas de la capa plexiforme externa no participa la subunidad HCN4 y en los de las células granulares no participa la subunidad HCN2. Es importante el hecho de que cada tipo de canal funcional esté integrado por distintas subunidades, porque es la composición final de cada canal lo que le confiere sus propiedades características (Ludwig y col., 1998; Moosmang y col., 2001; Holderith y col., 2003; Müller y col., 2003). Estos canales, aunque son sensibles a GMPc, necesitan casi 100 veces más cantidad de GMPc que de AMPc para poder activarse (Ludwig y col., 1998, 1999), de manera que es más probable que su función esté relacionada con la señalización de AMPc. Sin embargo, en células donde existe una gran producción de GMPc (como puedan ser las células principales después de la activación de la guanilato ciclase particulada) este nucleótido cíclico podría actuar sobre los HCN ejerciendo una función moduladora y conduciendo a la célula hacia su potencial de reposo (Ludwig y col., 1999; Müller y col., 2003; Rosenbaum y Gordon, 2004). En cualquier caso, podemos afirmar que estos canales no forman parte de la vía de señalización del óxido nítrico vía producción de GMPc, ya que prácticamente no hemos encontrado subunidades de estos canales en las células que contienen GCs.

6.1.4.2. *Distribución general de las PKG*

Como ya vieran otros autores en sus estudios (Gamm y col., 1995; Lohman y col., 1997; Vaandrager y col., 1997) hemos visto que la distribución de PKG1 y PKG2 en el bulbo olfatorio principal es muy diferente una de la otra. El estudio detallado de su distribución, además, nos ha permitido comprobar que ninguna de estas dos kinasas está implicada en la vía de transducción ON/GCs/GMPc.

6.1.4.2.1. *Distribución general de PKG1 β*

PKG1 β tiene una amplia distribución por todo el bulbo olfatorio, sugiriendo que pueda desempeñar una función clave en el correcto funcionamiento de este área cerebral. Los dos tipos celulares que expresan PKG1 β incluyen células principales e interneuronas. Las interneuronas que aparecen marcadas son: las células granulares, algunas células periglomerulares y algunas células profundas de axón corto. Las células periglomerulares que presentan inmunorreactividad para PKG1 β muestran unas características neuroquímicas y de conectividad dentro del glomérulo heterogéneas: mientras que una parte de estas células periglomerulares son GABAérgicas y reciben contactos desde el nervio olfatorio, otra parte restringen sus dendritas al compartimento sináptico, no presentan inmunorreactividad para GABA y expresan CR.

Por otro lado, la mayoría, si no todo el conjunto de células granulares, presenta PKG1 β . Estudios recientes han mostrado que PKG1 está implicada en procesos de plasticidad sináptica y aprendizaje (Feil y col., 2005). La presencia de PKG1 β en las células granulares podría estar modulando de alguna forma la actividad de estas células y por lo tanto modulando la inhibición lateral que ejercen sobre las dendritas de las células principales en la capa plexiforme externa, que se sabe que es uno de los puntos clave de la circuitería del bulbo olfatorio principal en relación con el aprendizaje olfativo y la adquisición de memoria.

Al igual que CNGA3, PKG1 β se encuentra ampliamente distribuido en todas las células principales del bulbo olfatorio, de igual forma, el marcaje se encuentra tanto en el soma, como en las dendritas y en el segmento inicial del axón. La PKG1 transduce la señal del GMPc mediante la fosforilación de sus sustratos (Hofmann y col., 1992; Butt y col., 1993; Francis y Corbin, 1994; Gudi y col., 1999), uno de los cuales es la PDE5 (Thomas y col., 1990a,b; McAllister-Lucas y col., 1993; Corbin y Francis, 1999). Como se discutirá más adelante (en el apartado 6.1.4.3.), hemos visto que la PDE5 presenta el mismo patrón de distribución que la PKG1 β en cuanto a las células principales y granulares se refiere. Nosotros proponemos que en las células principales, el GMPc producido por la activación de la guanilato ciclasa particulada podría activar a la PKG1 β , que a su vez podría fosforilar, entre otros sustratos, a la PDE5. Cabe decir, además, que según nuestros datos la PKG1 β no está implicada en la vía de señalización del óxido nítrico vía producción de GMPc, ya que las células que contienen GCs no contienen PKG1 β .

6.1.4.2.2. *Distribución general de PKG2*

PKG2 presenta una distribución en el bulbo olfatorio muy diferente a la descrita para PKG1 β ; vemos que se encuentra únicamente en los procesos de los astrocitos. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en trabajos previos por otros autores, donde en otras regiones cerebrales observan la presencia de PKG2 en células gliales, atribuyéndole a esta

kinasa un papel importante en la regulación transcripcional de estas células (Gudi y col., 1999). Aunque estos autores atribuyen la actividad de la PKG2 a la activación de la GCs por el óxido nítrico sintetizado por la isoforma inducible de la NOS que se expresa en astrocitos, nosotros no hemos visto la existencia de GCs en células gliales, por lo que descartamos este papel en las células gliales del bulbo olfatorio principal.

6.1.4.3. **Distribución general de PDE5**

Se han realizado pocos estudios para analizar la expresión de PDE5 en el cerebro, pero todos ellos coinciden en que esta PDE tiene una distribución muy restringida, por lo que sugieren que podría estar implicada en vías de señalización celular muy específicas (Van Staveren y col., 2003). Entre las regiones cerebrales donde se ha demostrado su presencia se encuentra el bulbo olfatorio. Van Staveren y col. (2003) describieron la presencia del RNAm de PDE5 en la capa plexiforme externa, en la capa de las células granulares y en la capa de las células mitrales mediante hibridaciones *in situ*. Nuestros resultados confirman parte de esos datos, ya que vemos que las capas plexiforme externa y de las células granulares aparecen intensamente teñidas, aunque no la de las células mitrales. De hecho, nosotros no vemos marcaje inmunocitoquímico para PDE5 en ningún soma celular, únicamente lo encontramos en dendritas. La diferencia entre los datos obtenidos por Van Staveren y col. (2003) y los nuestros puede deberse a que ellos detectan RNAm que probablemente abundará en los somas, mientras que nosotros detectamos la enzima, que puede ejercer su función en las dendritas y no estar en niveles detectables en los somas.

Un dato importante, es que la distribución de PDE5 coincide en el bulbo olfatorio con la distribución de PKG1 β (como ya hemos indicado en el apartado 6.1.4.2.1.) en células principales y en células granulares. Estos datos estarían reforzando todos los datos previos que indican que la PDE5 incrementa su actividad después de ser fosforilada por PKG1 β (McAllister-Lucas, 1993; Corbin y Francis, 1999; Corbin y col., 2000; Murthy, 2001; Rybalkin y col., 2002). Sin embargo, y de manera excepcional, el único sitio donde no observamos colocación de ambas enzimas es en las células periglomerulares con GCs implicadas en la vía de transducción ON/GMPc/GCs. En estas interneuronas, la actividad PDE5 puede estar directamente activada y modulada por el propio GMPc (Mullershausen y col., 2003).

Es muy interesante destacar que en la vía de señalización de la guanilato ciclasa particulada, la PDE5 puede estar regulada por PKG1 β , como podría ocurrir en las células principales. Por el contrario, en la vía de señalización del óxido nítrico no está modulada por esta kinasa, sino por el propio GMPc.

6.1.5. Vía de la S-nitrosilación de proteínas

Hace ya más de 15 años que se propuso que el óxido nítrico tenía que tener una forma de regulación directa sobre sus dianas y que ésta fuera independiente de la activación de GCs y la

consecuente producción de GMPc (Ignarro, 1990; Moncada y col., 1991; Snyder, 1992). Algunos autores vieron por aquel entonces que el óxido nítrico podía actuar directamente sobre algunas proteínas, en concreto uniéndose químicamente a los grupos tiol de los residuos L-Cys, y propusieron que esta actuación debía tener un papel fisiológico importante. Años más tarde se demostró que esta vía de actuación, conocida con el nombre de S-nitrosilación, podía modular la función de canales de membrana (Lei y col., 1992; Lipton y Stamler, 1994; Bolotina y col., 1994; Lang y Watson, 1998; Li y col., 1998; Hammarstrom y Gage, 1999; Ahern y col., 2000; Jaffrey y col., 2001; Yoshimura y col., 2001) o de algunos elementos implicados en rutas de señalización intracelular en el sistema nervioso (Lander y col., 1996, 1997; delaTorre y col., 1998).

La S-nitrosilación tiene un efecto distinto en cada proteína sobre la que actúa. Por ejemplo, se ha visto que algunos canales de Ca^{2+} , que son inhibidos por óxido nítrico cuando este actúa activando la GCs, son activados cuando son S-nitrosilados (Campbell, 1996; Hogg, 2002). Por otro lado, cuando los receptores de glutamato de tipo NMDA son S-nitrosilados disminuye su actividad, impidiendo una entrada masiva de Ca^{2+} al interior celular (Broillet y Firestein, 1996; Lipton, 1999). Esta inhibición de la función de la proteína diana también ocurre cuando la nNOS es S-nitrosilada (Gow y col., 2002). La S-nitrosilación puede ocurrir en condiciones fisiológicas normales y es un proceso mucho más habitual de lo que se pensaba en un principio. Teniendo en cuenta esto, y el hecho de que el bulbo olfatorio es una región cerebral con una elevada síntesis de óxido nítrico, para nosotros era importante determinar si en esta región se estaba produciendo la S-nitrosilación de proteínas como mecanismo de actuación del gas en condiciones fisiológicas. Como describimos en los resultados, sin embargo, no detectamos proteínas S-nitrosiladas en ninguna célula del bulbo olfatorio. Para asegurarnos de que los resultados negativos obtenidos en el bulbo olfatorio no se debían al mal funcionamiento del anticuerpo utilizado en el estudio, realizamos algunas tinciones inmunocitoquímicas como controles en la zona subventricular y en la corriente migratoria rostral, donde previamente había sido descrita la existencia de proteínas S-nitrosiladas (Moreno-López y col., 2004; Romero-Grimaldi y col., 2006; Torroglosa y col., 2007); en estas regiones sí que observamos células con proteínas S-nitrosiladas (datos descritos con detalle en el apartado 6.2.2.). Por tanto, podemos concluir que la S-nitrosilación no es un método de actuación común del óxido nítrico en el bulbo olfatorio, al menos en condiciones normales.

6.1.6. Relación de los sistemas nitrérgico y dopaminérgico en los glomérulos olfatorios

Antes de discutir si existe o no una relación entre el sistema de transmisión dopaminérgico y el nitrérgico en el bulbo olfatorio, hay que dejar claros una serie de puntos. En primer lugar, conviene recordar que, como se ha mencionado en distintos apartados de esta tesis, el bulbo olfatorio es una de las regiones del cerebro donde más cantidad de óxido nítrico se produce (Bredt y col., 1991; Vincent y Kimura, 1992; Breer y Shepherd, 1993). En segundo lugar, es sabido que en el bulbo olfatorio principal nos encontramos con el mayor número de células dopaminérgicas

del cerebro. En tercer lugar, hay un elevado número de trabajos en los que se afirma que el óxido nítrico puede estar regulando la transmisión dopaminérgica (Hanbauer y col., 1992; Zhu y Luo, 1992; Lonart y col., 1993; Lorrain y Hull, 1993; Black y col., 1994; Bugnon y col., 1994; Gevara-Guzmán y col., 1994; Ishida y col., 1994; Stout y Woodward, 1994; Strasser y col., 1994; Lin y col., 1995; Ohno y col., 1995; Seilicovich y col., 1995; Joseph y col., 1996; Kendrick y col., 1996; Shibata y col., 1996; West y Galloway, 1996; Chaparro-Huerta y col., 1997; Liang y Kaufman, 1998; Segovia y Mora, 1998; Kiss y col., 1999). Puesto que se ha visto que la dopamina tiene un papel importante en la transmisión del input olfatorio (Hsia y col., 1999; Berkowickz y Trombley, 2000) y además modula la actividad de las células mitrales (Duchamp-Viret y col., 1997), es interesante discutir si existe algún tipo de relación entre el sistema nitrérgico y el sistema dopaminérgico en los glomérulos olfatorios. En primer lugar, consideraremos la posibilidad de que el óxido nítrico pueda estar afectando a las células productoras de dopamina. En segundo lugar, analizaremos si este gas podría actuar directamente sobre la dopamina. Por último, discutiremos si el óxido nítrico podría actuar sobre las células dopaminoceptivas (Esquema 4).

6.1.6.1. *Modulación de la transmisión dopaminérgica: actuación sobre las células productoras de dopamina*

Estudios previos en los que se ha estudiado el papel del óxido nítrico han descrito que este gas puede provocar dos efectos contrarios sobre la transmisión dopaminérgica. Algunos autores le otorgan al óxido nítrico un efecto estimulador de la transmisión dopaminérgica (Hanbauer y col., 1992; Zhu y Luo, 1992; Lonart y col., 1993; Lorrain y Hull, 1993; Black y col., 1994; Ishida y col., 1994; Stout y Woodward, 1994; Strasser y col., 1994; Ohno y col., 1995; Kendrick y col., 1996; West y Galloway, 1996; Chaparro-Huerta y col., 1997; Liang y Kaufman, 1998; Kiss y col., 1999), mientras que otros le atribuyen un papel claramente inhibitorio (Zhu y Luo, 1992; Black y col., 1994; Bugnon y col., 1994; Gevara-Guzmán y col., 1994; Lin y col., 1995; Seilicovich y col., 1995; Joseph y col., 1996; Shibata y col., 1996; Segovia y Mora, 1998). Dado que algunos autores han visto que la liberación de dopamina inducida por óxido nítrico es un proceso dependiente de Ca^{2+} (Lonart y col., 1993; Buyukuysal, 1997a,b), podríamos pensar que estuviera mediado por el sistema de señalización ON/GCs/GMPc y que el GMPc activase alguno de los canales que permiten la entrada de Ca^{2+} al interior celular (como puedan ser los CNG). Sin embargo, nosotros no hemos visto que las células encargadas de producir dopamina en el glomérulo olfatorio (PG1-TH) contengan GCs, por lo cual descartamos que exista una acción del óxido nítrico sobre las células dopaminérgicas mediada por GMPc. Nuestros datos, además, estarían en concordancia con los de otros autores (Lonart y col., 1993; Gevara-Guzmán y col., 1994; Stout y Woodward, 1994; Stewart y col., 1996; West y Galloway, 1996) que demuestran que el efecto del óxido nítrico sobre la transmisión dopaminérgica, en algunas regiones cerebrales, es independiente de la vía de activación de la GCs.

6.1.6.2 **Modulación de la transmisión dopaminérgica: actuación directa sobre la dopamina**

La dopamina es liberada al espacio extracelular de manera extrasináptica (Umbriaco y col., 1995; Vizi, 2000; Vizi y Labos, 1991) y desde aquí difunde brevemente hasta llegar a sus células diana donde actúa. La dopamina, según estudios realizados durante los últimos años (Nappi y Vass, 2001; Kytzia y col., 2006), podría ser modificada por nitrosilación, alterándose así su función. Nuestros resultados no muestran la existencia de dopamina nitrosada en los glomérulos olfatorios, ni en ninguna otra región del bulbo olfatorio principal. Por lo tanto, no parece que el óxido nítrico tenga un papel fisiológico en la modulación de la transmisión dopaminérgica por unión directa a la dopamina.

6.1.6.3 **Modulación de la transmisión dopaminérgica: actuación sobre las dianas de actuación de la dopamina**

Para poder determinar si el óxido nítrico afecta a las células dopaminoceptivas, antes tuvimos que analizar con detalle (como ya indicamos en el apartado correspondiente de resultados) cuáles eran estos elementos en el bulbo olfatorio principal. En relación a esto, discutiremos primero la distribución del receptor D2 de dopamina en los elementos de la circuitería glomerular y, después, cómo puede interrelacionarse la transmisión dopaminérgica y el óxido nítrico.

Resumiendo parte de los resultados que hacen referencia a este apartado, podemos decir que hemos encontrado receptor D2 de dopamina en los terminales axónicos del nervio olfatorio, en las dendritas intraglomerulares de las células principales y en algunas subpoblaciones de células periglomerulares.

6.1.6.3.1. *Receptor D2 de dopamina en los terminales axónicos del nervio olfatorio*

Estudios pioneros demostraron la existencia de altos niveles de unión para ligandos específicos del receptor D2 de dopamina en las capas del nervio olfatorio y de los glomérulos olfatorios del bulbo olfatorio principal de la rata (Palacios y col., 1981; Charuchinda y col., 1987; Van der Weide y col., 1987; Closse y col., 1988; Wamsley y col., 1989; Guthrie y col., 1991; Nickell y col., 1991). A la vista de los resultados de estos autores, se hipotetizó que estos receptores debían de estar presentes en los terminales de los axones olfatorios. Más recientemente, Koster y col. (1999) corroboraron esta hipótesis demostrando la presencia del RNAm del receptor en las neuronas receptoras de los olores. Desde un punto de vista funcional, datos electrofisiológicos indican que la dopamina reduce los inputs sinápticos en el bulbo olfatorio a través de la activación de receptor D2 de dopamina presináptico que estaría localizado en los terminales de los axones olfatorios (Hsia y col., 1999; Berkowicz y Trombley, 2000; Ennis y col., 2001). A pesar de todos estos datos, ninguno de los trabajos anteriores ha proporcionado una visualización subcelular del receptor D2 de dopamina en los terminales axónicos. Nuestros resultados demuestran que el receptor D2 de dopamina tiene una

distribución precisa en los terminales axónicos del nervio olfatorio: vemos que frecuentemente se encuentra asociado a la especialización presináptica de los contactos sinápticos asimétricos desde el nervio olfatorio. Este dato respalda la función presináptica propuesta para estos receptores mediante datos electrofisiológicos.

Es interesante destacar que el receptor D2 de dopamina aparece unido a los contactos sinápticos asimétricos que el nervio olfatorio realiza tanto sobre células principales como sobre algunas células periglomerulares. Estas células periglomerulares, a su vez, contactan con las células principales. Teniendo en cuenta la circuitería glomerular, la reducción del input olfatorio podría inducir en las células periglomerulares una disminución de la transmisión GABAérgica desde sus gémulas sobre las dendritas de las células principales. Esto indicaría que la reducción directa de la entrada de información sensorial en las células principales podría estar simultáneamente acompañada de una desinhibición de las mismas.

6.1.6.3.2. Receptor D2 de dopamina en las células principales

Uno de los resultados más llamativos que obtuvimos en esta parte de nuestro estudio, es la presencia inequívoca de receptor D2 de dopamina en las dendritas intraglomerulares de las células principales. La expresión de estos receptores ha sido recientemente descrita en cultivos de células mitrales de bulbo olfatorio de rata (Dávila y col., 2003). Otros estudios previos, sin embargo, no habían conseguido demostrar la presencia del receptor D2 de dopamina *in vivo* mediante técnicas de autorradiografía (Nickell y col., 1991; Koster y col., 1999), ni mediante técnicas de hibridación *in situ* (Mengod y col., 1989; Mansour y col., 1990; Coronas y col., 1997). A diferencia de estos dos métodos, cuya resolución no siempre es suficiente, el método utilizado en este estudio para detectar el receptor D2 de dopamina, técnicas inmunocitoquímicas en preinclusión utilizando partículas de oro coloidal, sí es suficientemente sensible para detectarlo en las dendritas intraglomerulares de las células principales. Esta técnica, además, permite establecer la localización subcelular específica del receptor dentro de las dendritas, demostrando que, a menudo, aparecen unidas a la especialización presináptica de los contactos sinápticos asimétricos que realizan las células principales sobre las células periglomerulares. Esta distribución parece indicar que la activación del receptor D2 de dopamina juega un papel funcional en las células principales, probablemente modulando presinápticamente sus sinapsis excitatorias sobre las células periglomerulares. Esta hipótesis ha sido previamente investigada en el bulbo olfatorio del ratón mediante electrofisiología (Ennis y col., 2001). Estos autores no vieron que la dopamina alterara las respuestas sinápticas de forma significativa. Otros autores (Dávila y col., 2003), sin embargo, utilizando cultivos de bulbo olfatorio de rata, mostraron que la dopamina y el agonista del receptor D2 de dopamina bromocriptina, modulaban los canales de Ca^{2+} y, por tanto, la transmisión excitatoria existente entre las células principales y otras interneuronas. Nuestros resultados respaldan los datos del experimento realizado por Dávila y col. (2003) y

proporcionan una base anatómica para explicar la modulación de la transmisión sináptica desde las células principales hacia las células periglomerulares mediado por dopamina, vía activación presináptica de los receptores D2 de dopamina.

Esta idea también está de acuerdo con trabajos previos donde se describe la presencia de receptores D2 de dopamina en las células principales del bulbo olfatorio de la rana utilizando técnicas de autorradiografía (Duchamp-Viret y col., 1997) e inmunocitoquímica (Davison y col., 2004). En la rana, los datos electrofisiológicos indican que la activación de los receptores D2 de dopamina presentes en las células mitrales inducen una reducción drástica del disparo espontáneo de las mismas (Duchamp-Viret y col., 1997) e inhibe las sinapsis de las células principales sobre otras interneuronas (Davison y col., 2004). La localización presináptica de los receptores D2 de dopamina en los contactos sinápticos asimétricos de las células principales de la rata sobre las células periglomerulares, respalda, en rata, una acción similar a la observada en la rana, al menos a nivel glomerular. Si el efecto presináptico es la inhibición de la transmisión excitatoria de las células principales sobre las interneuronas, como Davila y col. (2003) demostraron *in vitro* en la rata y Davison y col. (2004) vieron en la rana, este hecho induciría a una disminución en el *estatus* excitatorio de las células periglomerulares postsinápticas. De hecho, la disminución de este *estatus* excitatorio de las células periglomerulares podría inducir a disminuir sus acciones inhibitorias sobre las células principales, teniendo en cuenta la circuitería glomerular.

Además de esta argumentación funcional, no se pueden excluir otros papeles alternativos para la dopamina en las dendritas intraglomerulares de las células principales. Brünig y col. (1999) demostraron que la dopamina y el agonista del receptor D2 de dopamina facilita la transmisión GABAérgica modulando los receptores GABA_A. Un papel similar no puede ser descartado en las dendritas intraglomerulares de las células principales *in vivo*, teniendo en cuenta que en la rata los receptores GABA_A están presentes en las células principales (Giustetto y col., 1998; Panzanelli y col., 2004). Si esto es así, se debería inducir a un incremento de la inhibición de las células principales.

6.1.6.3.3. Receptor D2 de dopamina en las células periglomerulares

Otro resultado llamativo en nuestro estudio es la presencia del receptor D2 de dopamina en dendritas que no corresponden a perfiles de células principales. Hemos identificado estas dendritas como dendritas de células periglomerulares utilizando el criterio inequívoco de la sinaptología (Pinching y Powell, 1971a). Estos datos están de acuerdo con datos de la presencia de RNAm de receptor D2 de dopamina en una subpoblación de células periglomerulares del bulbo olfatorio de la rata que vieron Mansour y col. (1990). Análisis de secciones ultrafinas seriadas permiten asegurar que el receptor D2 de dopamina no aparece en toda la población de células periglomerulares. Estos receptores se han encontrado en dos

subpoblaciones distintas. Una de estas subpoblaciones es la integrada por las propias células periglomerulares dopaminérgicas, mientras que la otra son las que contienen la enzima GCs.

6.1.6.3.3.1. Presencia del receptor D2 de dopamina en células periglomerulares dopaminérgicas

La presencia del receptor D2 de dopamina en células periglomerulares dopaminérgicas podría indicar una función como autorreceptor, modulando la liberación de dopamina desde las gémulas de estas células. Una acción similar como autorreceptor ha sido ampliamente demostrada para el receptor D2 de dopamina en fibras dopaminérgicas de otras regiones del cerebro (Bjelke y col., 1996; Xu y col., 1999; Adell y Artigas, 2004). Un dato interesante es que en los terminales de los axones olfatorios y en las dendritas de las células principales, el receptor D2 de dopamina aparece en la mayoría de casos unido a la membrana plasmática. Sin embargo, en las gémulas de las células periglomerulares, las partículas de oro coloidal se encontraron sólo ocasionalmente en la membrana plasmática, estando la mayoría de las veces en el citoplasma. Este hecho, probablemente, refleja una internalización de los receptores D2 de dopamina en las gémulas de las células dopaminérgicas. Esta internalización del receptor puede estar inducida por dopamina, indicando un estado de baja afinidad del receptor, como ha sido previamente descrito (Ko y col., 2002).

6.1.6.3.3.2. Presencia del receptor D2 de dopamina en células periglomerulares que expresan GCs

La otra subpoblación de células periglomerulares donde encontramos receptor D2 de dopamina fue la subpoblación en la que había expresión de GCs. Esto implica, por tanto, que el sistema de transmisión nitrérgico sí que puede interrelacionarse con el sistema dopaminérgico en los glomérulos olfatorios. Nuestros datos ofrecen la base neuroanatómica para poder decir que los sistemas de transmisión nitrérgico y dopaminérgico confluyen en los glomérulos olfatorios en una subpoblación específica de PG2 con unas características neuroquímicas y de conectividad particulares.

6.2. ANÁLISIS DE LAS VÍAS DE ACTUACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA CORRIENTE MIGRATORIA ROSTRAL

6.2.1. Vía de actuación de la GCs

Hemos visto que los neuroblastos migrantes o células de tipo A de la corriente migratoria rostral y las neuronas inmaduras que migran por las capas del bulbo olfatorio principal contienen GCs y, por tanto, pueden responder al óxido nítrico mediante la producción de GMPc. Además,

nuestros datos indican que al menos los CNG deben ser los transductores intracelulares para el GMPc en estas células. Tomando estos datos en conjunto, nuestro estudio proporciona una base anatómica que demuestra que el óxido nítrico puede participar en el control de la neurogénesis adulta a través de la vía de señalización del GMPc, probablemente afectando a la migración celular como discutiremos más adelante (Esquema 5).

6.2.1.1. **Identificación de las células que contienen GCs en la corriente migratoria rostral**

La tipología celular de la corriente migratoria rostral es similar a la tipología celular descrita en la zona subventricular (Gritti y col., 2002). Las dos poblaciones celulares mayoritarias en la corriente migratoria rostral son los neuroblastos migrantes, o células de tipo A y los astrocitos, o células de tipo B (Lois y col., 1996; Doetsch y col., 1997; García-Verdugo y col., 1998; Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; Gritti y col., 2002). Las células de tipo A están organizadas en cadenas y estas cadenas están rodeadas por las células de tipo B, constituyendo estructuras similares a tubos, que son los que integran la corriente migratoria rostral. Además, a lo largo de toda la corriente migratoria rostral, incluyendo la porción más rostral dentro del bulbo olfatorio principal, también aparecen precursores neuronales inmaduros o células de tipo C que son altamente proliferativos (Gritti y col., 2002). Estas células forman grupos y aparecen pegadas a las cadenas de las células de tipo A. Finalmente, en los niveles más rostrales de la corriente migratoria rostral, se observan algunos ependimocitos o células de tipo E recubriendo las paredes del ventrículo olfatorio remanente, situado en la porción más profunda del bulbo olfatorio principal (Gritti y col., 2002).

Teniendo en cuenta esta tipología celular, hemos identificado a los neuroblastos migrantes o células de tipo A como las células que expresan la enzima GCs, basándonos en criterios morfológicos y ultraestructurales (Lois y col., 1996; Doetsch y col., 1997; García-Verdugo y col., 1998). Por el contrario, hemos concluido que ni los precursores neuronales inmaduros o células de tipo C, ni los astrocitos o células de tipo B, ni los ependimocitos o células de tipo E, contienen GCs. Estos datos han sido confirmados mediante criterios neuroquímicos. Por un lado, la doblecortina se expresa en células de tipo A tanto en la zona subventricular como en la corriente migratoria rostral (Nácher y col., 2001). En nuestro estudio, hemos visto que las células que expresan GCs también expresan doblecortina y son, por tanto, células de tipo A. Por otro lado, las células de tipo B y las de tipo E expresan GFAP (Doetsch y col., 1997); nosotros hemos utilizado este marcador para confirmar que estos dos tipos celulares no expresan GCs. Actualmente no existen marcadores neuroquímicos para marcar las células de tipo C de forma específica; sin embargo, podemos asumir que la mayoría de células BrdU-positivas encontradas en la corriente migratoria rostral dos horas después de la inyección intraperitoneal de BrdU son células de tipo C, ya que las células de tipo C son células con una altísima tasa de proliferación (Doetsch y col., 1997). La inexistencia de GCs en las células marcadas con BrdU en la corriente migratoria rostral indica que las células de tipo C no expresan GCs. Todos juntos, estos datos

refuerzan la idea de que la GCs se expresa específica y exclusivamente en los neuroblastos migrantes o células de tipo A de la corriente migratoria rostral. A esto, debemos añadir el hecho de haber visto que las neuronas inmaduras que están en proceso de migración radial por las capas del bulbo olfatorio principal, identificadas por su morfología y por la expresión de doblecortina, también expresan GCs. La presencia de la GCs tanto en las células de tipo A como en las migrantes hace pensar que el óxido nítrico pueda tener un papel muy importante en relación con la producción, llegada e incorporación de nuevas células al bulbo olfatorio principal.

6.2.1.2. **Óxido nítrico y proliferación**

Frecuentemente se ha dicho que el óxido nítrico puede regular la proliferación celular en el cerebro de mamíferos, tanto durante el desarrollo del animal como en su estadio adulto. La proliferación celular se encuentra regulada negativamente por óxido nítrico durante el desarrollo perinatal del cerebro de la rata (Ciani y col., 2006) o durante el desarrollo embrionario de la retina de pollo (Magalhaes y col., 2006). Este mensajero gaseoso también ha sido relacionado con el control de la proliferación celular en las dos regiones neurogénicas del cerebro de mamíferos adultos: la zona subventricular (Cheng y col., 2003; Packer y col., 2003; Moreno-López y col., 2004; Matarredona y col., 2004, 2005; Cárdenas y col., 2005; Estrada y Murillo-Carretero., 2005; Romero-Grimaldi y col., 2006; Torroglosa y col., 2007) y el giro dentado del hipocampo (Packer y col., 2003; Zhu y col., 2003, 2006; Reif y col., 2004). En ambos sistemas neurogénicos se ha descrito un efecto antiproliferativo del óxido nítrico en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, Packer y col. (2003) han visto que el número de células de nueva generación en las regiones neurogénicas de un ratón *knockout* para la nNOS se encuentra drásticamente aumentada. Además, se ha demostrado que la inhibición farmacológica, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, de la síntesis de óxido nítrico tiene como respuesta un aumento de la proliferación de precursores neuronales en la zona subventricular y en el giro dentado (Cheng y col., 2003; Packer y col., 2003; Matarredona y col., 2004; Moreno-López y col., 2004; Romero-Grimaldi y col., 2006; Zhu y col., 2006; Torroglosa y col., 2007).

Como actividad opuesta, también se ha descrito que el óxido nítrico puede aumentar la proliferación de los precursores neuronales, al menos durante el desarrollo postnatal más temprano (Chen y col., 2004) y después de una lesión cerebral (Zhu y col., 2003; Chen y col., 2005). Por ejemplo, se ha demostrado que un aumento en la síntesis del óxido nítrico causado por la activación de la iNOS después de un problema cerebral originado por isquemia, está acoplado con una mayor proliferación en el giro dentado (Zhu y col., 2003). Además, otros estudios indican que la ausencia de eNOS disminuye la neurogénesis en el giro dentado (Reif y col., 2004) y en la zona subventricular (Chen y col., 2005). La discrepancia surgida de todos estos resultados opuestos ha sido recientemente discutida, atribuyéndosele al óxido nítrico un doble papel en la proliferación, dependiendo de cuál sea la fuente de óxido nítrico y en

definitiva, de cuál sea la concentración del gas en los tejidos (Sun y col., 2005; Cárdenas y col., 2005).

En cualquier caso, las posibles dianas para una acción del óxido nítrico en relación con la proliferación celular podrían ser las células proliferantes o células de tipo C. Tanto en la zona subventricular como en la corriente migratoria rostral se ha demostrado que los astrocitos o células de tipo B actúan como células madre que generan los neuroblastos migrantes o células de tipo A (Doetsch y col., 1999; Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002). También se ha demostrado que tanto las células de tipo B como las de tipo C y las de tipo A pueden dividirse (Doetsch y col., 1997; García-Verdugo y col., 1998). Doetsch y col. (1997) han descrito que las células de tipo C son las células proliferantes más activas en la zona subventricular y Moreno-López y col. (2004) han considerado que estas células serían las dianas de la acción antiproliferativa que ellos describen para el óxido nítrico. Además, se ha propuesto que los mecanismos celulares que subyacen a la acción antiproliferativa del óxido nítrico en estas células implican la inhibición del receptor del factor de crecimiento epidérmico por la S-nitrosilación del mismo (Romero-Grimaldi y col., 2006; Torroglosa y col., 2007), sin implicar a la síntesis de GMPc (Torroglosa y col., 2007). La falta de expresión de GCs que nosotros hemos encontrado en las células de tipo C está íntimamente relacionada con la idea de que la acción antiproliferativa del óxido nítrico en las células de tipo C no está mediada por la activación de la GCs y la producción de GMPc, tal y como sugieren Torroglosa y col. (2007). Nuestros datos, tomados en conjunto, refuerzan la hipótesis de que la vía de señalización del óxido nítrico que implica la activación de la GCs y la producción de GMPc en la corriente migratoria rostral no tiene ningún papel en la proliferación celular. Nosotros sugerimos que el óxido nítrico ha de tener otro efecto distinto al de la inhibición de la proliferación celular en la zona subventricular y corriente migratoria rostral. Nuestros datos demuestran que este efecto es ejercido en las células de tipo A mediante la activación de la GCs. Teniendo en cuenta que las células de tipo A son neuroblastos migrantes y, por lo tanto, migran largas distancias desde la zona subventricular hasta el bulbo olfatorio principal a través de la corriente migratoria rostral, nosotros proponemos que el papel del óxido nítrico en estas células debería estar relacionado más con la migración celular que con la proliferación.

Por tanto, el óxido nítrico parece tener una doble acción tanto en la zona subventricular como en la corriente migratoria rostral. Por un lado, el óxido nítrico ha de regular la proliferación de las células de tipo C a través de un mecanismo que implique la nitrosilación de proteínas (Moreno-López y col., 2004; Romero-Grimaldi y col., 2006; Torroglosa y col., 2007). Por otro lado, podría regular la migración celular de las células de tipo A a través de la vía ON/GCs/GMPc (parte de este trabajo).

6.2.1.3. **Óxido nítrico y migración celular**

Está ampliamente demostrado que una de las acciones del óxido nítrico consiste en regular la migración celular. Aunque se ha prestado más atención al papel que tiene en la migración de las células endoteliales en procesos relacionados con la angiogénesis, también existen evidencias de su implicación en la migración de las células del sistema nervioso (Tanaka y col., 1994; Scott y col., 1995; Scott y Hansen, 1997; Contestabile, 2000; Gibson y col., 2001; Duan y col., 2003; Haase y Bicker, 2003; Bicker, 2005, 2007; Chen y col., 2005). Por ejemplo, Gibson y col. (2001) demostraron que el óxido nítrico liberado desde los axones olfatorios es una señal que induce a la migración a células gliales durante la formación del lóbulo de la antena en el sistema olfatorio de *Manduca sexta*. Además, en un trabajo realizado por Haase y Bicker (2003), donde se utilizó como modelo un estadio embrionario del saltamontes, muestran, inequívocamente, que el óxido nítrico regula la migración neuronal. Estos autores concluyen que el efecto del óxido nítrico está mediado por la activación de la GCs y la producción de GMPc. Para ello, demuestran que la inhibición farmacológica de la NOS o de la GCs bloquea la migración neuronal, mientras que este bloqueo puede ser anulado suplementando GCs o GMPc (Haase y Bicker, 2003; Bicker, 2005, 2007). En el desarrollo del cerebelo de rata, Tanaka y col. (1994) demostraron que la inhibición de la NOS o la adición de sequestradores del óxido nítrico disminuye la migración de las células granulares. Scott y col. (1995), vieron que el óxido nítrico es necesario para la migración neuronal en el cerebro adulto de mamíferos después de infligirle una lesión. Según todos estos datos, obtenidos en distintos modelos, se puede apreciar que el óxido nítrico promueve la migración celular en el sistema nervioso. En esta parte del trabajo nosotros demostramos que, específicamente, los neuroblastos migrantes de la corriente migratoria rostral contienen GCs y, por tanto, pueden responder al óxido nítrico. Estos datos sugieren una implicación funcional de la vía de señalización ON/GCs/GMPc en la migración de las células de tipo A a través de la corriente migratoria rostral.

El papel del óxido nítrico en la migración de las células de la zona subventricular y la corriente migratoria rostral ha sido previamente analizado y todavía existen controversias a la hora de discutir los resultados. Por un lado, Moreno-López y col. (2004) describieron que el óxido nítrico no afecta a la migración de las células de la corriente migratoria rostral. Por otro lado, Chen y col. (2005) demostraron, utilizando modelos de explantes, que el óxido nítrico afecta a la migración de las células de la zona subventricular, y concluyen en su artículo que la eNOS está influenciando la migración celular en las células de la zona subventricular. Es interesante destacar que los neuroblastos migrantes que contienen la maquinaria para responder al óxido nítrico (la GCs y los CNG) están agrupados adyacentes a los vasos sanguíneos y, por lo tanto, están expuestos al óxido nítrico producido por la eNOS de estos vasos, como discutiremos a continuación.

6.2.1.4. **Fuentes de óxido nítrico en la corriente migratoria rostral**

Cuando se analiza el papel del óxido nítrico en la regulación de la neurogénesis adulta, un punto interesante para resolver, es la identificación de las fuentes que producen óxido nítrico en las regiones neurogénicas. Estudios previos han demostrado la presencia de células que contienen nNOS alrededor de la corriente migratoria rostral a lo largo de toda su extensión rostrocaudal (Moreno-López y col., 2000). Además, la expresión de la nNOS es evidente desde el día 10 postnatal (Racekova y col., 2003) y persiste durante toda la vida del animal (Racekova y col., 2005). Estos datos anatómicos indican que las células de la corriente migratoria rostral pueden estar bajo la influencia del óxido nítrico producido por las neuronas adyacentes que contienen la nNOS. Otra posible fuente de óxido nítrico en la corriente migratoria rostral son las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Dos hechos indican que el gas producido por los vasos sanguíneos puede estar modulando la migración de los neuroblastos migrantes de la corriente migratoria rostral. El primero de ellos es que los neuroblastos migrantes se encuentran frecuentemente asociados a los vasos sanguíneos y, por lo tanto, están expuestos a la acción del óxido nítrico producido por la eNOS. El segundo de ellos, es el estudio de Chen y col. (2005) donde, utilizando ratones *knockout* para eNOS, se observó una clara ausencia de migración celular en explantes de zona subventricular.

6.2.1.5. **Transducción intracelular de la señalización por óxido nítrico en neuroblastos migrantes.**

Como hemos visto, los CNG son unos de los transductores intracelulares de la señalización ON/GCs/GMPc. Los CNG son canales catiónicos no selectivos que se activan por la unión directa de nucleótidos cíclicos, incluyendo tanto AMPc como GMPc (Kaupp y Seifert, 2002). Una de las propiedades de los CNG es permitir la entrada de Ca^{2+} , el cual juega un papel clave en algunos eventos celulares, incluyendo la migración celular (Komuro y Kumada, 2005). En un experimento muy interesante, Michalakis y col. (2005), utilizando ratones deficientes en CNGA3, demostraron que esta subunidad es esencial para la migración postnatal de los conos de la retina. Por lo tanto, los CNG, y en particular los compuestos por la subunidad CNGA3 son unos candidatos razonables para ser estudiados como transductores de la señalización ON/GCs/GMPc en las células de tipo A.

En este trabajo hemos demostrado que tanto las células de tipo A de la corriente migratoria rostral, como las células que dejan la corriente migratoria rostral y comienzan con la migración radial, expresan elevadas cantidades de CNGA3. También hemos demostrado que ningún otro posible transductor de GMPc de los analizados (CNGA2, HCN1, HCN2, HCN4, PKG1 β , PKG2 o PDE5) se encuentra en los neuroblastos migrantes ni en las neuronas inmaduras. Nosotros proponemos que la activación de la GCs por parte del óxido nítrico en los neuroblastos migrantes y en las células inmaduras elevan los niveles intracelulares de GMPc, que podría unirse a los CNG y abrirlos, permitiendo así la entrada de calcio al interior celular (Esquema 5).

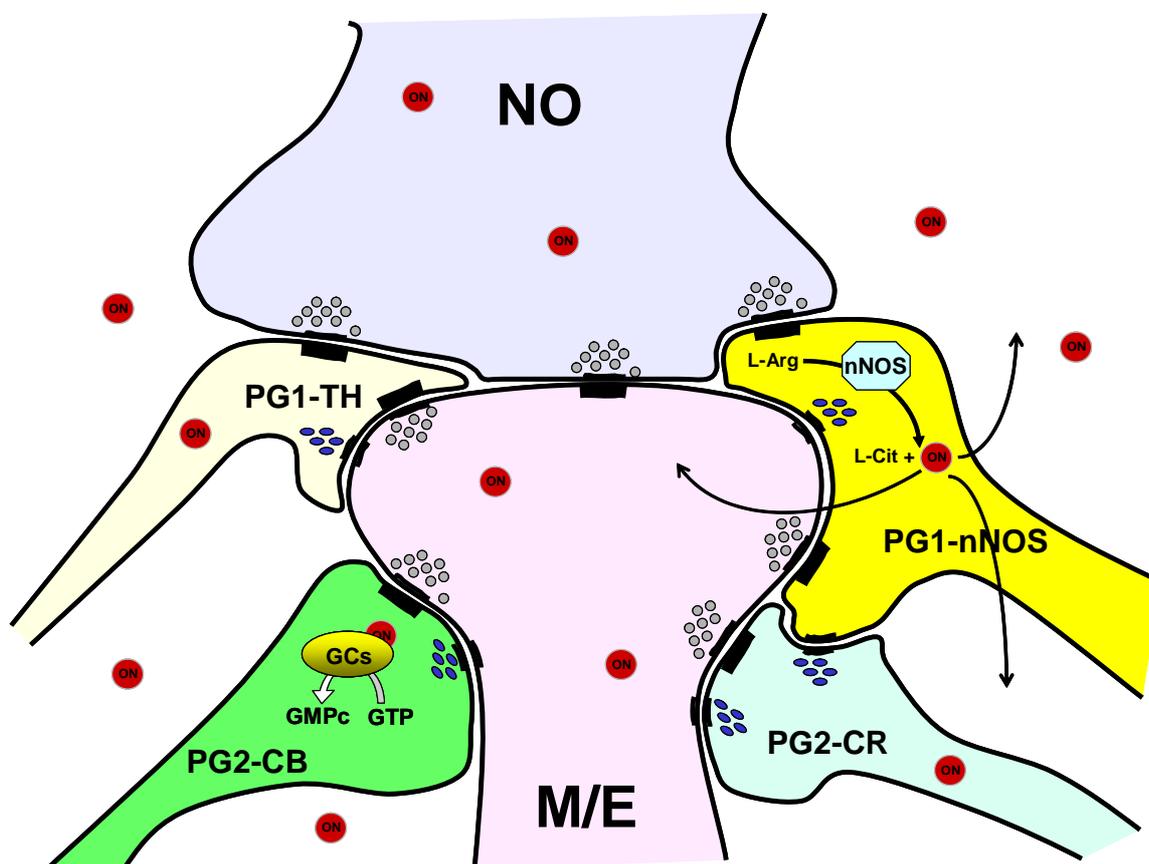
En este punto proponemos que los CNG, compuestos por subunidades de CNGA3, puedan constituir una vía de transducción efectiva para el sistema ON/GCs/GMPc, permitiendo obtener fluctuaciones de Ca^{2+} intracelular rápidas y precisas que puedan influenciar la migración tangencial y radial de los neuroblastos. Está ampliamente descrito que la señalización por Ca^{2+} actúa como neuromodulador para controlar la migración de neuronas inmaduras (Komuro y Kumada, 2005). Por ejemplo, cambios en los gradientes de Ca^{2+} intracelular en el interior del soma de las células granulares del cerebelo, revierten la dirección de su movimiento (Xu y col., 2004). Además, se ha demostrado que estas células presentan un patrón de elevadas concentraciones de Ca^{2+} transitorio diferente conforme estas células migran por las diferentes capas corticales (Kumada y Komuro, 2004). De forma muy similar, fluctuaciones transitorias de Ca^{2+} intracelular podrían ser cruciales para guiar a los neuroblastos migrantes a través de la corriente migratoria rostral hacia su emplazamiento final en el bulbo olfatorio principal. Relacionado con esto, la señalización ON/GCs/GMPc/CNG podría constituir un sistema efectivo para obtener fluctuaciones precisas y rápidas del Ca^{2+} intracelular.

Nuestros datos indican que la corriente migratoria rostral es un excelente modelo para analizar las implicaciones funcionales de las vías de señalización ON/GCs/GMPc en la migración celular y en la neurogénesis adulta. Nuestros datos anatómicos constituyen una base sobre la que diseñar investigaciones futuras en este campo tan interesante.

6.2.2. Vía de la nitrosilación de proteínas

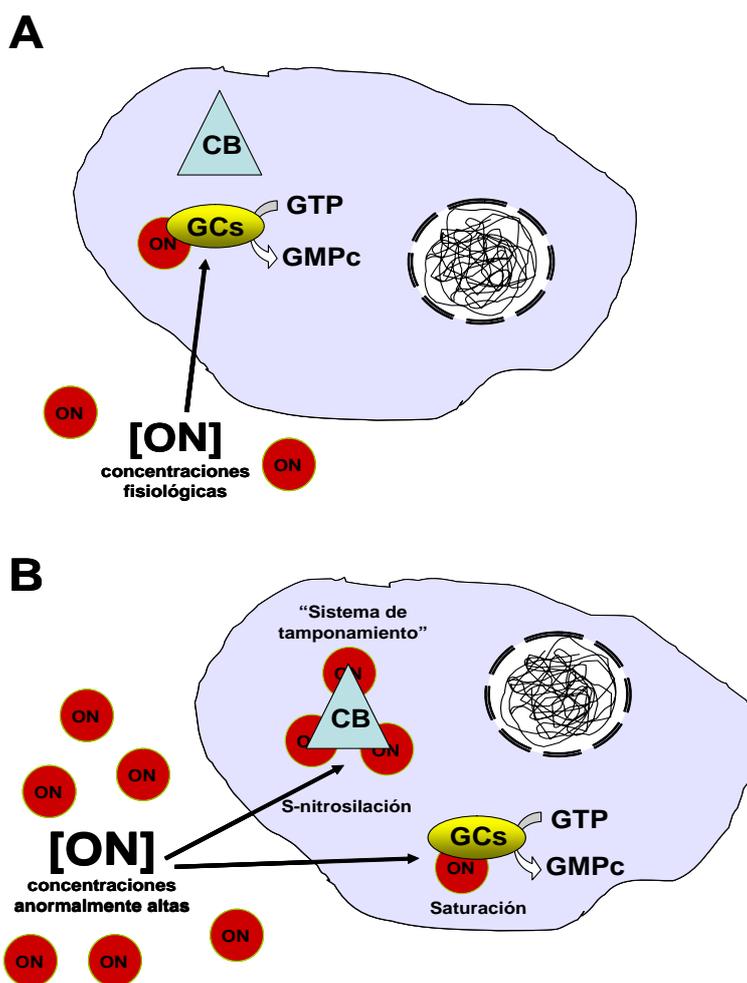
Como se ha descrito previamente en el apartado 6.2.1.2. con relación a la implicación que tiene el óxido nítrico en la proliferación celular, se ha propuesto que este gas tenga una acción antiproliferativa en las células de tipo C de la corriente migratoria rostral (Moreno-López y col., 2004; Romero-Grimaldi y col., 2006; Torroglosa y col., 2007). Además, estos autores proponen que el proceso de proliferación de las células de tipo C es independiente de la activación de la GCs y de la producción de GMPc. Según su modelo, en condiciones fisiológicas, el óxido nítrico producido próximo a la corriente migratoria rostral (véase apartado 6.2.1.4.) actuaría sobre las células de tipo C inhibiendo su proliferación. Esta inhibición se produciría por un mecanismo de S-nitrosilación de alguna de las proteínas de estas células; en concreto, se ha descrito que podría ser sobre el receptor del factor de crecimiento epitelial (Romero-Grimaldi y col., 2006; Torroglosa y col., 2007). Los resultados que hemos obtenido en este estudio podrían confirmar estos datos, ya que hemos visto que algunas células de la zona subventricular y de la corriente migratoria rostral están S-nitrosiladas. Estas células podrían ser las células de tipo C que describen Moreno-López y col.(2004).

ESQUEMAS



Esquema 1. Señalización del óxido nítrico en la circuitería de los glomérulos olfatorios.

Las PG1-nNOS envían sus dendritas hasta el compartimento sensorial; allí reciben contactos sinápticos glutamatérgicos que estimulan la producción de óxido nítrico. El óxido nítrico producido difunde libremente por el neuropilo glomerular pudiendo llegar a todos los elementos que lo integran. Sin embargo, solamente las PG2-CB, que expresan GCs, responden al gas produciendo grandes cantidades de GMPc. De esta forma se establece un sistema de comunicación no sináptico entre dos elementos muy concretos de la circuitería del glomérulo olfatorio.

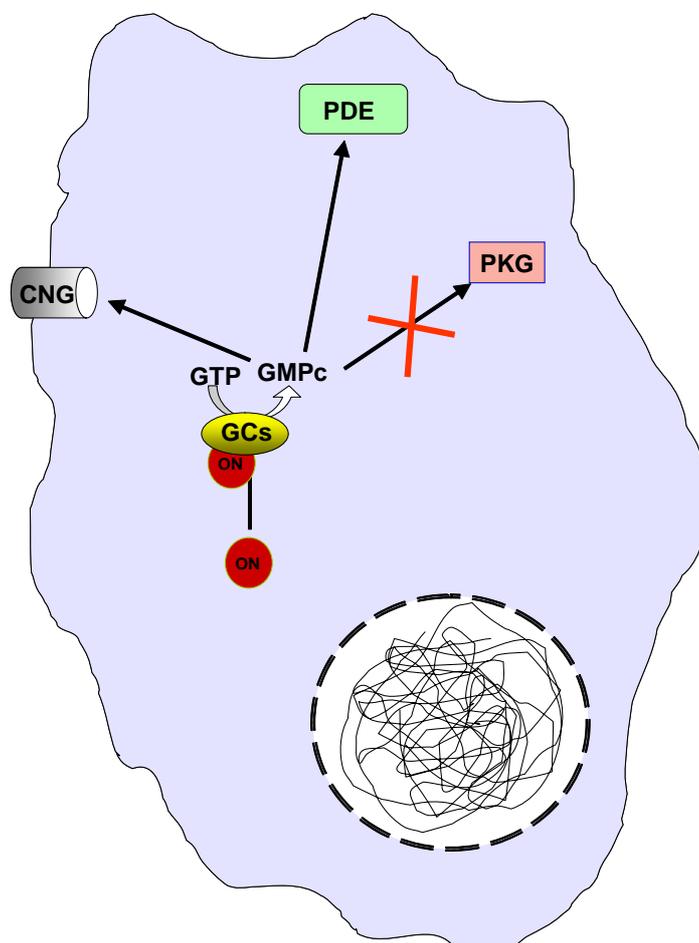


Esquema 2. Relación existente entre la GCs y la CB.

Basándonos en datos previos de Tao et al. (2002) y a la vista de nuestros resultados anatómicos, establecemos la siguiente hipótesis para explicar la relación existente entre la expresión de GCs y la de la proteína ligante de calcio CB.

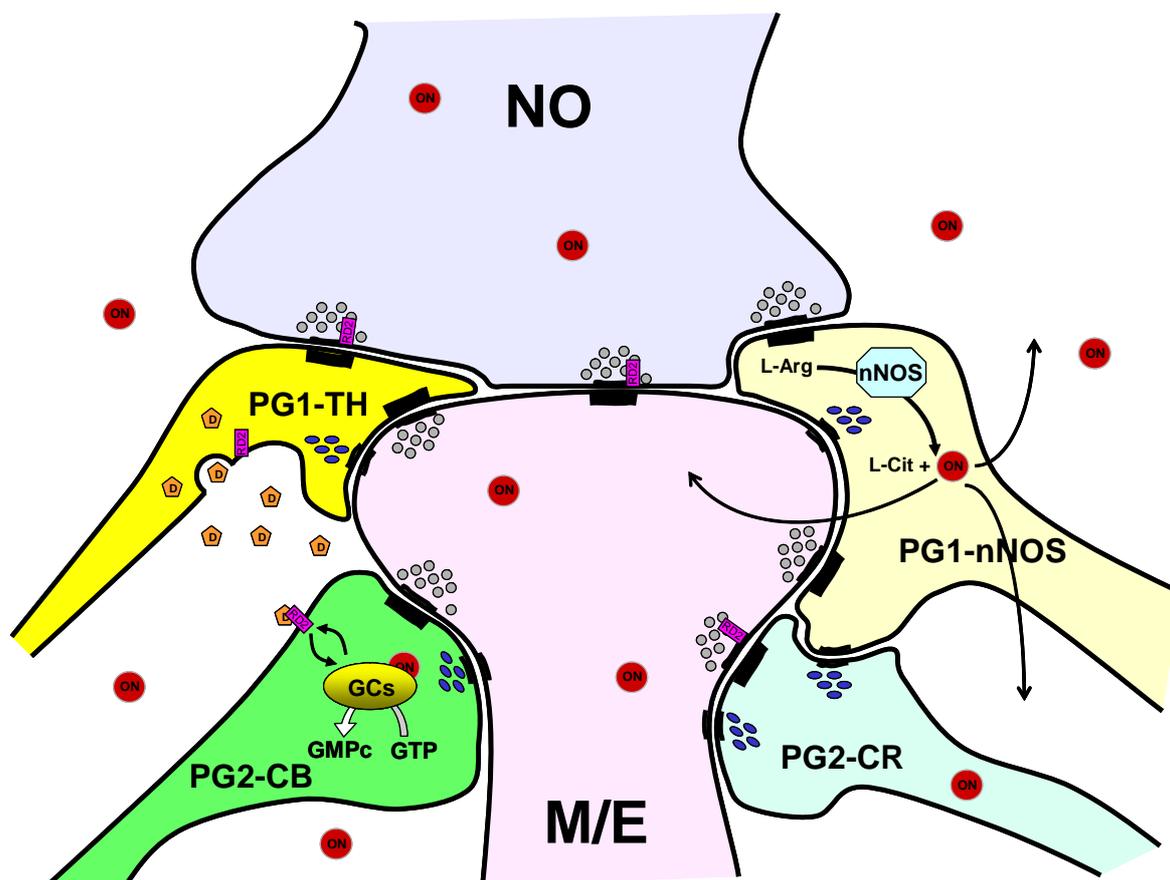
(A) En condiciones fisiológicas, el óxido nítrico producido por las células nitrérgicas se uniría a la GCs activando así la producción de GMPc.

(B) Si por alguna razón se produjera óxido nítrico en cantidades anormalmente altas, y la GCs de estas células estuviera ya saturada, el gas nitrosilaría los residuos L-Cys de la CB, proteína que podría actuar como “elemento tamponador” del óxido nítrico en estas neuronas.



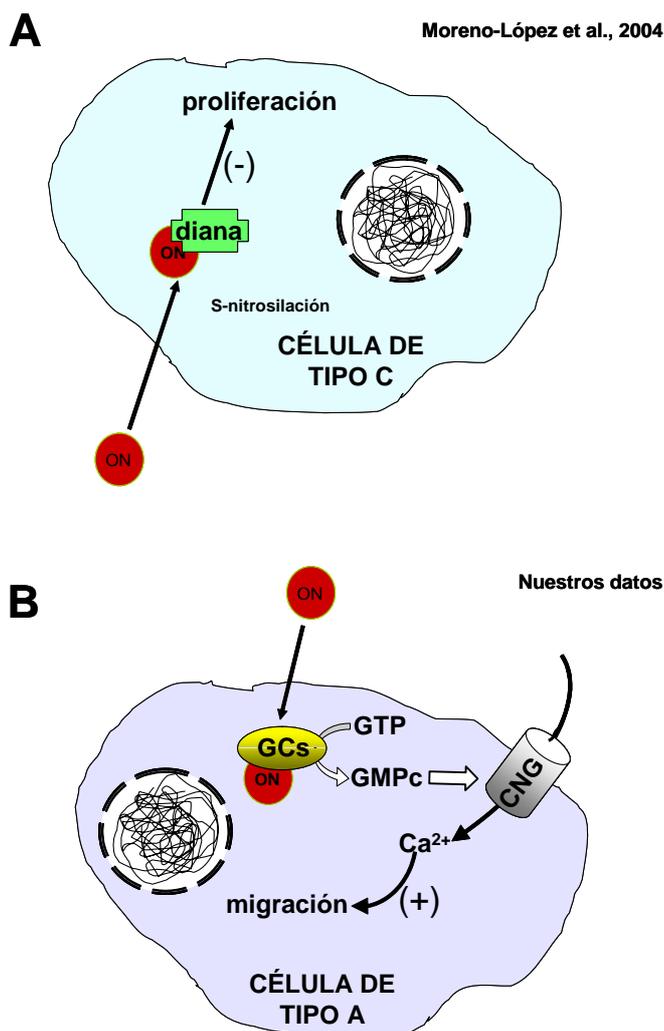
Esquema 3. Posibles vías de transducción intracelular de la señalización por óxido nítrico en las neuronas del bulbo olfatorio principal.

El GMPc, como segundo mensajero, puede actuar dentro de las células por tres posibles vías de transducción de señales diferentes. Según nuestros resultado, la vía que utiliza PKG no está implicada en la señalización por óxido nítrico en las interneuronas del bulbo olfatorio que contienen GCs. La vía que utiliza los CNG puede estar implicada, pero de forma muy puntual. La vía que utiliza PDE sería la principal vía de transducción para el GMPc en estas interneuronas.



Esquema 4. Relación existente entre los sistemas de neurotransmisión nitrérgico y dopaminérgico.

Nuestros resultados demuestran que el óxido nítrico (ON) puede actuar sobre la transmisión dopaminérgica en los circuitos de los glomérulos olfatorios. Esta acción se centraría en las PG2-CB que expresan GCs y que además contienen el receptor D2 de dopamina (RD2), siendo por lo tanto dopaminoceptivas.



Esqema 5. Posibles vías de transducción intracelular del óxido nítrico en las células de la corriente migratoria rostral y en las células inmaduras del bulbo olfatorio principal en migración radial.

(A) Según trabajos previos (Moreno López et al. 2004), el óxido nítrico regula negativamente la proliferación de las células de tipo C de la corriente migratoria rostral a través de un mecanismo que implica S-nitrosilación de algunas proteínas.

(B) Nuestros datos añaden un nuevo mecanismo de acción para el óxido nítrico en la corriente migratoria rostral. Nosotros demostramos que el óxido nítrico puede actuar sobre las células de tipo A de la corriente migratoria rostral activando la GCs y por tanto la producción de GMPc. Este segundo mensajero puede unirse a CNG, lo que supondría una entrada masiva de Ca^{2+} , que podría facilitar la migración de estas células.

CONCLUSIONES

1. En condiciones fisiológicas, el óxido nítrico actúa sobre los circuitos neuronales del bulbo olfatorio por la vía de la activación de la enzima GCs y la producción de GMPc. No hemos visto una actuación de este gas a través de la vía de la S-nitrosilación de proteínas.
2. En los circuitos neuronales del bulbo olfatorio, el óxido nítrico no actúa sobre todos los elementos. Ejerce su función exclusivamente sobre interneuronas y nunca sobre células principales.
3. En estas interneuronas, la transducción intracelular de la señal del óxido nítrico estaría mediada por algunos de los canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos y por algunas fosfodiesterasas. Descartamos que la transducción de esta señal esté mediada por proteínas kinasas dependientes de GMPc.
4. En la corriente migratoria rostral, el óxido nítrico tendría un efecto en la regulación de la migración de los neuroblastos que se encuentran en proceso de migración tangencial. También lo tendría en las neuronas inmaduras que, abandonando la corriente migratoria rostral, han comenzado la migración radial a través de las capas del bulbo olfatorio.
5. Este efecto sobre la migración de los neuroblastos estaría mediado por la activación de la GCs y la producción de GMPc, que actuaría a través de canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos que contienen la subunidad A3.

BIBLIOGRAFÍA

1. A Adell and F Artigas (2004): The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehav Rev.* 28:415.
2. GP Ahern, VA Klyachko, and MB Jackson (2002): cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci.* 25:510.
3. I Ahmad, T Leinders-Zufall, JD Kocsis, GM Shepherd, F Zufall, and CJ Barnstable (1994): Retinal ganglion cells express a cGMP-gated cation conductance activatable by nitric oxide donors. *Neuron* 12:155.
4. AC Allison (1953): The structure of the olfactory bulb and its relationship to the olfactory pathways in the rabbit and the rat. *J Comp Neurol.* 98:309.
5. JR Alonso, R Arévalo, A Porteros, JG Briñón, J Lara, and J Aijón (1993): Calbindin D-28K and NADPH-diaphorase activity are localized in different populations of periglomerular cells in the rat olfactory bulb. *J Chem Neuroanat.* 6:1.
6. JR Alonso, R Arévalo, E García-Ojeda, A Porteros, JG Briñón, and J Aijón (1995): NADPH-diaphorase active and calbindin D-28k-immunoreactive neurons and fibers in the olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J Comp Neurol.* 351:307.
7. JR Alonso, JG Briñón, C Crespo, IG Bravo, R Arévalo, and J Aijón (2001): Chemical organization of the macaque monkey olfactory bulb: II. Calretinin, calbindin D-28k, parvalbumin, and neurocalcin immunoreactivity. *J Comp Neurol.* 432:389.
8. A Álvarez-Buylla and JM García-Verdugo (2002): Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* 22:629.
9. SG Andreeva, P Dikkes, PM Epstein, and PA Rosenberg (2001): Expression of cGMP-specific phosphodiesterase 9A mRNA in the rat brain. *J Neurosci.* 21:9068.
10. KH Andres (1965): The fine structure of the olfactory bulb in rats with special reference to the synaptic connections. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 65:530.
11. PJ Andrew and B Mayer (1999): Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.* 43:521.
12. C Aoki, J Rhee, M Lubin, and TM Dawson (1997): NMDA-R1 subunit of the cerebral cortex co-localizes with neuronal nitric oxide synthase at pre- and postsynaptic sites and in spines. *Brain Res.* 750:25.
13. Arancio, I Antonova, S Gambaryan, SM Lohmann, JS Wood, DS Lawrence, and RD Hawkins (2001): Presynaptic role of cGMP-dependent protein kinase during long-lasting potentiation. *J Neurosci.* 21:143.
14. JL Aungst, PM Heyward, AC Puche, SV Karnup, A Hayar, G Szabo, and MT Shipley (2003): Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature* 426:623.
15. MA Baltrons, S Saadoun, L Agullo, and A García (1997): Regulation by calcium of the nitric oxide/cyclic GMP system in cerebellar granule cells and astroglia in culture. *J Neurosci Res.* 49:333.
16. MS Barnette, M Grous, CD Manning, JF Callahan, and FC Barone (1990): Inhibition of neuronally induced relaxation of canine lower esophageal sphincter by opioid peptides. *Eur J Pharmacol.* 182:363.
17. CJ Barnstable, JY Wei, and MH Han (2004): Modulation of synaptic function by cGMP and cGMP-gated cation channels. *Neurochem Int.* 45:875.

18. E Bastianelli, K Okazaki, H Hidaka, and R Pochet (1993): Neurocalcin immunoreactivity in rat olfactory bulb. *Neurosci Lett.* 161:165.
19. JA Beavo (1995): Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 75:725.
20. B Beltran, MD Barrachina, A Mendez, E Quintero, and JV Esplugues (1999): Synthesis of nitric oxide in the dorsal motor nucleus of the vagus mediates the inhibition of gastric acid secretion by central bombesin. *Br J Pharmacol.* 127:1603.
21. AT Bender and JA Beavo (2004): Specific localized expression of cGMP PDEs in Purkinje neurons and macrophages. *Neurochem Int.* 45:853.
22. RA Bender, A Brewster, B Santoro, A Ludwig, F Hofmann, M Biel, and TZ Baram (2001): Differential and age-dependent expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel isoforms 1-4 suggests evolving roles in the developing rat hippocampus. *Neuroscience* 106:689.
23. DA Berkowicz and PQ Trombley (2000): Dopaminergic modulation at the olfactory nerve synapse. *Brain Res.* 855:90.
24. R Bernabeu, P Schmitz, MP Faillace, I Izquierdo, and JH Medina (1996): Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport* 7:585.
25. R Bernabeu, N Schroder, J Quevedo, M Cammarota, I Izquierdo, and JH Medina (1997): Further evidence for the involvement of a hippocampal cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. *Neuroreport* 8:2221.
26. G Bicker (2005): STOP and GO with NO: nitric oxide as a regulator of cell motility in simple brains. *Bioessays* 27:495.
27. G Bicker (2007): Pharmacological approaches to nitric oxide signalling during neural development of locusts and other model insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 64:43.
28. M Biel, A Sautter, A Ludwig, F Hofmann, and X Zong (1998): Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 358:140.
29. M Biel, X Zong, and F Hofmann (1999): Cyclic nucleotide gated channels. *Adv.Second Messenger Phosphoprotein Res.* 33:231.
30. M Biel, A Schneider, and C Wahl (2002): Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc.Med.* 12:206.
31. B Bjelke, M Goldstein, B Tinner, C Andersson, SR Sesack, HW Steinbusch, JY Lew, X He, S Watson, B Tengroth, and K Fuxe (1996): Dopaminergic transmission in the rat retina: evidence for volume transmission. *J Chem Neuroanat.* 12:37.
32. MD Black, EK Matthews, and PP Humphrey (1994): The effects of a photosensitive nitric oxide donor on basal and electrically-stimulated dopamine efflux from the rat striatum in vitro. *Neuropharmacology* 33:1357.
33. A Blokland, J Prickaerts, W Honig, and J de Vente (1998): State-dependent impairment in object recognition after hippocampal NOS inhibition. *Neuroreport* 9:4205.
34. GE Boeckxstaens, JG De Man, PA Pelckmans, AG Herman, and YM Van Maercke (1993): Alpha 2-adrenoceptor-mediated modulation of the nitrergic innervation of the canine isolated ileocolonic junction. *Br J Pharmacol.* 109:1079.

35. JJ Bogers, PA Pelckmans, GE Boeckxstaens, JG De Man, AG Herman, and YM Van Maercke (1991): The role of nitric oxide in serotonin-induced relaxations in the canine terminal ileum and ileocolonic junction. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 344:716.
36. GA Böhme, C Bon, M Lemaire, M Reibaud, O Piot, JM Stutzmann, A Doble, and JC Blanchard (1993): Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90:9191.
37. VM Bolotina, S Najibi, JJ Palacino, PJ Pagano, and RA Cohen (1994): Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368:850.
38. W Bonigk, J Bradley, F Muller, F Sesti, I Boekhoff, GV Ronnett, UB Kaupp, and S Frings (1999): The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. *J Neurosci.* 19:5332.
39. J Bradley, J Li, N Davidson, HA Lester, and K Zinn (1994): Heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels: a subunit that confers increased sensitivity to cAMP. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91:8890.
40. J Bradley, Y Zhang, R Bakin, HA Lester, GV Ronnett, and K Zinn (1997): Functional expression of the heteromeric "olfactory" cyclic nucleotide-gated channel in the hippocampus: a potential effector of synaptic plasticity in brain neurons. *J Neurosci.* 17:1993.
41. J Bradley, J Reisert, and S Frings (2005): Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Curr Opin Neurobiol.* 15:343.
42. DS Bredt, CE Glatt, PM Hwang, M Fotuhi, TM Dawson, and SH Snyder (1991): Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7:615.
43. DS Bredt and SH Snyder (1992): Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8:3.
44. H Breer and GM Shepherd (1993): Implications of the NO/cGMP system for olfaction. *Trends Neurosci.* 16:5.
45. JE Brenman, DS Chao, SH Gee, AW McGee, SE Craven, DR Santillano, Z Wu, F Huang, H Xia, MF Peters, SC Froehner, and DS Bredt (1996): Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84:757.
46. JE Brenman and DS Bredt (1997): Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol.* 7:374.
47. PA Brennan and EB Keverne (1997): Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Prog Neurobiol.* 51:457.
48. A Brewster, RA Bender, Y Chen, C Dube, M Eghbal-Ahmadi, and TZ Baram (2002): Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. *J Neurosci.* 22:4591.
49. JG Briñón, JR Alonso, R Arévalo, E García-Ojeda, J Lara, and J Aijón (1992): Calbindin D-28k-positive neurons in the rat olfactory bulb. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 269:289.
50. JG Briñón, JR Alonso, E García-Ojeda, C Crespo, R Arévalo, and J Aijón (1997): Calretinin- and parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat main olfactory bulb do not express NADPH-diaphorase activity. *J Chem Neuroanat.* 13:253.
51. JG Briñón, R Arévalo, C Crespo, IG Bravo, K Okazaki, H Hidaka, J Aijón, and JR Alonso (1998): Neurocalcin immunoreactivity in the rat main olfactory bulb. *Brain Res.* 795:204.

52. MC Broillet and S Firestein (1996): Gaseous second messengers in vertebrate olfaction. *J Neurobiol.* 30:49.
53. MC Broillet and S Firestein (1997): Beta subunits of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel form a nitric oxide activated Ca²⁺ channel. *Neuron* 18:951.
54. MC Broillet and S Firestein (1999): Cyclic nucleotide-gated channels. Molecular mechanisms of activation. *Ann N Y Acad Sci.* 868:730.
55. MC Broillet (1999): S-nitrosylation of proteins. *Cell Mol Life Sci.* 55:1036.
56. I Brünig, M Sommer, H Hatt, and J Bormann (1999): Dopamine receptor subtypes modulate olfactory bulb gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96:2456.
57. Bugnon, NC Schaad, and M Schorderet (1994): Nitric oxide modulates endogenous dopamine release in bovine retina. *Neuroreport* 5:401.
58. AR Butler, FW Flitney, and DL Williams (1995): NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci.* 16:18.
59. E Butt, J Geiger, T Jarchau, SM Lohmann, and U Walter (1993): The cGMP-dependent protein kinase-gene, protein, and function. *Neurochem Res.* 18:27.
60. RL Buyukuysal (1997a): Effect of nitric oxide donors on endogenous dopamine release from rat striatal slices. I: Requirement to antioxidants in the medium. *Fundam Clin Phramacol.* 11:519.
61. RL Buyukuysal (1997b): Effect of nitric oxide donors on endogenous dopamine release from rat striatal slices. II: The role of voltage-dependent sodium channels, calcium channel activation, reverse transport mechanism, guanylate cyclase and endogenous glutamate. *Fundam Clin Phramacol.* 11:528.
62. SR Cajal (1911): Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Paris.
63. DL Campbell, JS Stamler, and HC Strauss (1996): Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J Gen Physiol* 108:277.
64. A Cárdenas, MA Moro, O Hurtado, JC Leza, and I Lizasoain (2005): Dual role of nitric oxide in adult neurogenesis. *Brain Res Brain Res Rev.* 50:1.
65. MV Catani, F Bernassola, A Rossi, and G Melino (1998): Inhibition of clotting factor XIII activity by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 249:275.
66. MR Celio (1990): Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375.
67. TI Chao, P Kasa, and JR Wolff (1997): Distribution of astroglia in glomeruli of the rat main olfactory bulb: exclusion from the sensory subcompartment of neuropil. *J Comp Neurol.* 388:191.
68. V Chaparro-Huerta, C Beas-Zarate, MU Guerrero, and A Feria-Velasco (1997): Nitric oxide involvement in regulating the dopamine transport in the striatal region of rat brain. *Neurochem Int.* 31:607.
69. PF Chapman, CM Atkins, MT Allen, JE Haley, and JE Steinmetz (1992): Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuroreport* 3:567.
70. C Charuchinda, P Supavilai, M Karobath, and JM Palacios (1987): Dopamine D2 receptors in the rat brain: autoradiographic visualization using a high-affinity selective agonist ligand. *J Neurosci.* 7:1352.

71. J Chen, Y Tu, C Moon, V Matarazzo, AM Palmer, and GV Ronnett (2004): The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance. *Dev Biol.* 269:165.
72. J Chen, A Zacharek, C Zhang, H Jiang, Y Li, C Roberts, M Lu, A Kapke, and M Chopp (2005): Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J Neurosci.* 25:2366.
73. A Cheng, S Wang, J Cai, MS Rao, and MP Mattson (2003): Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev Biol.* 258:319.
74. J Cheng and JP Grande (2007): Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors: novel therapeutic agents for progressive renal disease. *Exp Biol Med.(Maywood.)* 232:38.
75. YB Choi, L Tenneti, DA Le, J Ortiz, G Bai, HS Chen, and SA Lipton (2000): Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci.* 3:15.
76. MI Chuah and AK West (2002): Cellular and molecular biology of ensheathing cells. *Microsc Res Tech.* 58:216.
77. E Ciani, V Calvanese, C Crochemore, R Bartesaghi, and A Contestabile (2006): Proliferation of cerebellar precursor cells is negatively regulated by nitric oxide in newborn rat. *J Cell Sci.* 119:3161.
78. A Closse, M Camps, A Wanner, and JM Palacios (1988): In vivo labeling of brain dopamine D2 receptors using the high-affinity specific D2 agonist [3H]CV 205-502. *Brain Res.* 440:123.
79. S Coco, F Calegari, E Pravettoni, D Pozzi, E Taverna, P Rosa, M Matteoli, and C Verderio (2003): Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem.* 278:1354.
80. GL Collingridge and RA Lester (1989): Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev.* 41:143.
81. A Contestabile (2000): Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Brain Res Rev.* 32:476.
82. M Conti, W Richter, C Mehats, G Livera, JY Park, and C Jin (2003): Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem.* 278:5493.
83. JD Corbin and SH Francis (1999): Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J Biol Chem.* 274:13729.
84. JD Corbin, IV Turko, A Beasley, and SH Francis (2000): Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur J Biochem.* 267:2760.
85. JD Corbin, J Richie-Jannetta, JL Busch, M Blount, E Bessay, J Weeks, G Morris, S Francis (2006): cGMP-dependent protein kinases structure, regulation and cellular negative feedback. Abstract en el *II Simposio Internacional del Óxido Nítrico*. Valencia.
86. V Coronas, LK Srivastava, JJ Liang, F Jourdan, and E Moyse (1997): Identification and localization of dopamine receptor subtypes in rat olfactory mucosa and bulb: a combined in situ hybridization and ligand binding radioautographic approach. *J Chem Neuroanat.* 12:243.
87. PA Craven and FR DeRubertis (1978): Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *J Biol Chem.* 253:8433.

88. C Crespo, R Arévalo, JG Briñón, A Porteros, IG Bravo, J Aijón, and JR Alonso (1995): Colocalization of NADPH-diaphorase and acetylcholinesterase in the rat olfactory bulb. *J Chem Neuroanat.* 9:207.
89. C Crespo, JM Blasco-Ibáñez, AI Marqués-Marí, and FJ Martínez-Guijarro (2001): Parvalbumin-containing interneurons do not innervate granule cells in the olfactory bulb. *Neuroreport* 12:2553.
90. C Crespo, FJ Gracia-Llanes, JM Blasco-Ibáñez, M Gutiérrez-Mecinas, AI Marqués-Marí, and FJ Martínez-Guijarro (2003): Nitric oxide synthase containing periglomerular cells are GABAergic in the rat olfactory bulb. *Neurosci Lett.* 349:151.
91. C Crespo, FJ Gracia-Llanes, M Gutiérrez-Mecinas, JM Blasco-Ibáñez, AI Marqués-Marí, J Nacer, E Varea, FJ Martínez-Guijarro (2006): El bulbo olfatorio de los mamíferos: aspectos de su organización anatómica. En "La olfacción en España". Ed SBI SL.
92. CE Croul-Ottman and PC Brunjes (1988): NADPH diaphorase staining within the developing olfactory bulbs of normal and unilaterally odor-deprived rats. *Brain Res.* 460:323.
93. S Daff, MA Noble, DH Craig, SL Rivers, SK Chapman, AW Munro, S Fujiwara, E Rozhkova, I Sagami, and T Shimizu (2001): Control of electron transfer in neuronal NO synthase. *Biochem Soc Trans.* 29:147.
94. NG Davila, LJ Blakemore, and PQ Trombley (2003): Dopamine modulates synaptic transmission between rat olfactory bulb neurons in culture. *J Neurophysiol.* 90:395.
95. NG Davila, LJ Blakemore, and PQ Trombley (2003): Dopamine modulates synaptic transmission between rat olfactory bulb neurons in culture. *J Neurophysiol.* 90:395.
96. BJ Davis (1991): NADPH-diaphorase activity in the olfactory system of the hamster and rat. *J Comp Neurol.* 314:493.
97. IG Davison, JD Boyd, and KR Delaney (2004): Dopamine inhibits mitral/tufted-> granule cell synapses in the frog olfactory bulb. *J Neurosci.* 24:8057.
98. TM Dawson and SH Snyder (1994): Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci.* 14:5147.
99. J de Vente, JG Bol, and HW Steinbusch (1989): Localization of cGMP in the cerebellum of the adult rat: an immunohistochemical study. *Brain Res.* 504:332.
100. J de Vente, DA Hopkins, M Markerink-Van Ittersum, PC Emson, HH Schmidt, and HW Steinbusch (1998): Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain. *Neuroscience* 87:207.
101. J de Vente and HWM Steinbusch (2000): Nitric oxide-cGMP signalling in the rat brain. En "Functional neuroanatomy of the nitric oxide system. Handbook of chemical neuroanatomy." Elsevier.
102. J de Vente, E Asan, S Gambaryan, M Markerink-Van Ittersum, H Axer, K Gallatz, SM Lohmann, and M Palkovits (2001): Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain. *Neuroscience* 108:27.
103. A delaTorre, RA Schroeder, ST Bartlett, and PC Kuo (1998): Differential effects of nitric oxide-mediated S-nitrosylation on p50 and c-jun DNA binding. *Surgery* 124:137.
104. JW Denninger and MA Marletta (1999): Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411:334.
105. RS Dhallan, KW Yau, KA Schrader, and RR Reed (1990): Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* 347:184.

106. C Ding, ED Potter, W Qiu, SL Coon, MA Levine, and SE Guggino (1997): Cloning and widespread distribution of the rat rod-type cyclic nucleotide-gated cation channel. *Am J Physiol* 272:C1335.
107. JD Ding, A Burette, PI Nedvetsky, HH Schmidt, and RJ Weinberg (2004): Distribution of soluble guanylyl cyclase in the rat brain. *J Comp Neurol.* 472:437.
108. F Doetsch, JM García-Verdugo, and A Álvarez-Buylla (1997): Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 17:5046.
109. F Doetsch, I Caille, DA Lim, JM García-Verdugo, and A Álvarez-Buylla (1999): Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703.
110. R Doucette (1989): Development of the nerve fiber layer in the olfactory bulb of mouse embryos. *J Comp Neurol.* 285:514.
111. TP Dousa (1999): Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int.* 55:29.
112. Y Duan, SJ Haugabook, CL Sahley, and KJ Muller (2003): Methylene blue blocks cGMP production and disrupts directed migration of microglia to nerve lesions in the leech CNS. *J Neurobiol.* 57:183.
113. P Duchamp-Viret, V Coronas, JC Delaleu, E Moyse, and A Duchamp (1997): Dopaminergic modulation of mitral cell activity in the frog olfactory bulb: a combined radioligand binding-electrophysiological study. *Neuroscience* 79:203.
114. TM Edwards, NS Rickard, and KT Ng (2002): Inhibition of guanylate cyclase and protein kinase G impairs retention for the passive avoidance task in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem.* 77:313.
115. V Egger, K Svoboda, and ZF Mainen (2003): Mechanisms of lateral inhibition in the olfactory bulb: efficiency and modulation of spike-evoked calcium influx into granule cells. *J Neurosci.* 23:7551.
116. V Egger and NN Urban (2006): Dynamic connectivity in the mitral cell-granule cell microcircuit. *Semin Cell Dev Biol.* 17:424.
117. AE el Hussein, C Bladen, and SR Vincent (1995): Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *J Neurochem.* 64:2814.
118. AE el Hussein, C Bladen, JA Williams, PB Reiner, and SR Vincent (1998): Nitric oxide regulates cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylation in rat brain. *J Neurochem.* 71:676.
119. AE el Hussein, J Williams, PB Reiner, S Pelech, and SR Vincent (1999): Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain. *J Chem Neuroanat.* 17:45.
120. M Ennis, FM Zhou, KJ Ciombor, V Aroniadou-Anderjaska, A Hayar, E Borrelli, LA Zimmer, F Margolis, and MT Shipley (2001): Dopamine D2 receptor-mediated presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals. *J Neurophysiol.* 86:2986.
121. JV Esplagues (2002): NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol.* 135:1079.
122. LB Estall, SJ Grant, and GA Cicala (1993): Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 46:959.
123. C Estrada and M Murillo-Carretero (2005): Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist.* 11:294.

124. L Fawcett, R Baxendale, P Stacey, C McGrouther, I Harrow, S Soderling, J Hetman, JA Beavo, and SC Phillips (2000): Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97:3702.
125. R Feil, J Kellermann, and F Hofmann (1995): Functional cGMP-dependent protein kinase is phosphorylated in its catalytic domain at threonine-516. *Biochemistry* 34:13152.
126. S Feil, P Zimmermann, A Knorn, S Brummer, J Schlossmann, F Hofmann, and R Feil (2005): Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina. *Neuroscience* 135:863.
127. C Fin, C da Cunha, E Bromberg, PK Schmitz, M Bianchin, JH Medina, and I Izquierdo (1995): Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. *Neurobiol Learn Mem.* 63:113.
128. TL Fink, SH Francis, A Beasley, KA Grimes, and JD Corbin (1999): Expression of an active, monomeric catalytic domain of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *J Biol Chem.* 274:34613.
129. JT Finn, ME Grunwald, and KW Yau (1996): Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions. *Annu Rev Physiol* 58:395.
130. DA Fisher, JF Smith, JS Pillar, SH St Denis, and JB Cheng (1998): Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem.* 273:15559.
131. MW Foster, TJ McMahon, and JS Stamler (2003): S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol.Med.* 9:160.
132. SH Francis and JD Corbin (1994): Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol* 56:237.
133. SH Francis, JA Smith, JL Colbran, K Grimes, KA Walsh, S Kumar, and JD Corbin (1996): Arginine 75 in the pseudosubstrate sequence of type Ibeta cGMP-dependent protein kinase is critical for autoinhibition, although autophosphorylated serine 63 is outside this sequence. *J Biol Chem.* 271:20748.
134. SH Francis, DM Chu, MK Thomas, A Beasley, K Grimes, JL Busch, IV Turko, TL Haik, and JD Corbin (1998): Ligand-induced conformational changes in cyclic nucleotide phosphodiesterases and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Methods* 14:81.
135. SH Francis, IV Turko, KA Grimes, and JD Corbin (2000): Histidine-607 and histidine-643 provide important interactions for metal support of catalysis in phosphodiesterase-5. *Biochemistry* 39:9591.
136. SH Francis, IV Turko, and JD Corbin (2001): Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 65:1.
137. Franz, B Liss, A Neu, and J Roeper (2000): Single-cell mRNA expression of HCN1 correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (Ih) in central neurons. *Eur J Neurosci.* 12:2685.
138. PJ French, J Bijman, M Edixhoven, AB Vaandrager, BJ Scholte, SM Lohmann, AC Nairn, and HR De Jonge (1995): Isozyme-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 270:26626.
139. A Friebe and D Koesling (2003): Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res.* 93:96.
140. S Frings, R Seifert, M Godde, and UB Kaupp (1995): Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 15:169.

141. K Fujishige, J Kotera, H Michibata, K Yuasa, S Takebayashi, K Okumura, and K Omori (1999): Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *J Biol Chem.* 274:18438.
142. T Furuyama, Y Iwahashi, Y Tano, H Takagi, and S Inagaki (1994): Localization of 63-kDa calmodulin-stimulated phosphodiesterase mRNA in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Brain Res Mol Brain Res.* 26:331.
143. CM Gall, SH Hendry, KB Seroogy, EG Jones, and JW Haycock (1987): Evidence for coexistence of GABA and dopamine in neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 266:307.
144. JA Gally, PR Montague, GN Reeke, Jr., and GM Edelman (1990): The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 87:3547.
145. DM Gamm, SH Francis, TP Angelotti, JD Corbin, and MD Uhler (1995): The type II isoform of cGMP-dependent protein kinase is dimeric and possesses regulatory and catalytic properties distinct from the type I isoforms. *J Biol Chem.* 270:27380.
146. DM Gamm, LK Barthel, PA Raymond, and MD Uhler (2000): Localization of cGMP-dependent protein kinase isoforms in mouse eye. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 41:2766.
147. JM García-Verdugo, F Doetsch, H Wichterle, DA Lim, and A Álvarez-Buylla (1998): Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol.* 36:234.
148. J Garthwaite, SL Charles, and R Chess-Williams (1988): Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385.
149. J Garthwaite (1991): Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14:60.
150. J Garthwaite and CL Boulton (1995): Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57:683.
151. B Gaston, J Reilly, JM Drazen, J Fackler, P Ramdev, D Arnelle, ME Mullins, DJ Sugarbaker, C Chee, DJ Singel, and . (1993): Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90:10957.
152. BM Gaston, J Carver, A Doctor, and LA Palmer (2003): S-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol Interv.* 3:253.
153. SM Gibbs and JW Truman (1998): Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe of *Drosophila*. *Neuron* 20:83.
154. SM Gibbs, A Becker, RW Hardy, and JW Truman (2001): Soluble guanylate cyclase is required during development for visual system function in *Drosophila*. *J Neurosci.* 21:7705.
155. NJ Gibson, W Rossler, AJ Nighorn, LA Oland, JG Hildebrand, and LP Tolbert (2001): Neuron-glia communication via nitric oxide is essential in establishing antennal-lobe structure in *Manduca sexta*. *Dev Biol.* 240:326.
156. PG Gillespie and JA Beavo (1988): Characterization of a bovine cone photoreceptor phosphodiesterase purified by cyclic GMP-sepharose chromatography. *J Biol Chem.* 263:8133.
157. D Giordano, ME De Stefano, G Citro, A Modica, and M Giorgi (2001): Expression of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using an antibody against the enzyme amino-terminal domain. *Biochim Biophys Acta* 1539:16.

158. M Giustetto, J Kirsch, JM Fritschy, D Cantino, and M Sassoe-Pognetto (1998): Localization of the clustering protein gephyrin at GABAergic synapses in the main olfactory bulb of the rat. *J Comp Neurol.* 395:231.
159. SE Gordon, MD Varnum, and WN Zagotta (1997): Direct interaction between amino- and carboxyl-terminal domains of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 19:431.
160. EH Goulding, GR Tibbs, and SA Siegelbaum (1994): Molecular mechanism of cyclic-nucleotide-gated channel activation. *Nature* 372:369.
161. AJ Gow, Q Chen, DT Hess, BJ Day, H Ischiropoulos, and JS Stamler (2002): Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *J Biol Chem.* 277:9637.
162. FJ Gracia-Llanes, C Crespo, JM Blasco-Ibáñez, AI Marqués-Marí, and FJ Martínez-Guijarro (2003): VIP-containing deep short-axon cells of the olfactory bulb innervate interneurons different from granule cells. *Eur J Neurosci.* 18:1751.
163. MP Gray-Keller and PB Detwiler (1994): The calcium feedback signal in the phototransduction cascade of vertebrate rods. *Neuron* 13:849.
164. A Gritti, L Bonfanti, F Doetsch, I Caille, A Álvarez-Buylla, DA Lim, R Galli, JM Verdugo, DG Herrera, and AL Vescovi (2002): Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci.* 22:437.
165. T Gudi, GK Hong, AB Vaandrager, SM Lohmann, and RB Pilz (1999): Nitric oxide and cGMP regulate gene expression in neuronal and glial cells by activating type II cGMP-dependent protein kinase. *FASEB J.* 13:2143.
166. R Guevara-Guzman, PC Emson, and KM Kendrick (1994): Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem.* 62:807.
167. M Guipponi, HS Scott, J Kudoh, K Kawasaki, K Shibuya, A Shintani, S Asakawa, H Chen, MD Lalioti, C Rossier, S Minoshima, N Shimizu, and SE Antonarakis (1998): Identification and characterization of a novel cyclic nucleotide phosphodiesterase gene (PDE9A) that maps to 21q22.3: alternative splicing of mRNA transcripts, genomic structure and sequence. *Hum Genet.* 103:386.
168. FX Guix, I Uribesalgo, M Coma, and FJ Munoz (2005): The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol.* 76:126.
169. LE Gustafsson, CU Wiklund, NP Wiklund, MG Persson, and S Moncada (1990): Modulation of autonomic neuroeffector transmission by nitric oxide in guinea pig ileum. *Biochem Biophys Res Commun.* 173:106.
170. KM Guthrie, JM Pullara, JF Marshall, and M Leon (1991): Olfactory deprivation increases dopamine D2 receptor density in the rat olfactory bulb. *Synapse* 8:61.
171. M Gutiérrez-Mecinas, C Crespo, JM Blasco-Ibáñez, FJ Gracia-Llanes, AI Marqués-Marí, and FJ Martínez-Guijarro (2005): Characterization of somatostatin- and cholecystokinin-immunoreactive periglomerular cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 489:467.
172. A Haase and G Bicker (2003): Nitric oxide and cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo. *Development* 130:3977.
173. J Haendeler, J Hoffmann, V Tischler, BC Berk, AM Zeiher, and S Dimmeler (2002): Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat Cell Biol.* 4:743.

174. N Halasz, T Hokfelt, AW Norman, and M Goldstein (1985): Tyrosine hydroxylase and 28K-vitamin D-dependent calcium binding protein are localized in different subpopulations of periglomerular cells of the rat olfactory bulb. *Neurosci Lett.* 61:103.
175. N Halasz and CA Greer (1993): Terminal arborizations of olfactory nerve fibers in the glomeruli of the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 337:307.
176. AK Hammarstrom and PW Gage (1999): Nitric oxide increases persistent sodium current in rat hippocampal neurons. *J. Physiol* 520 Pt 2:451.
177. I Hanbauer, D Wink, Y Osawa, GM Edelman, and JA Gally (1992): Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices. *Neuroreport* 3:409.
178. S Hayat, A Thomas, F Afshar, R Sonigra, and CB Wigley (2003a): Manipulation of olfactory ensheathing cell signaling mechanisms: effects on their support for neurite regrowth from adult CNS neurons in coculture. *Glia* 44:232.
179. S Hayat, CB Wigley, and J Robbins (2003b): Intracellular calcium handling in rat olfactory ensheathing cells and its role in axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci.* 22:259.
180. P Hedlund, A Aszodi, A Pfeifer, P Alm, F Hofmann, M Ahmad, R Fassler, and KE Andersson (2000): Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97:2349.
181. FW Herberg, SS Taylor, and WR Dostmann (1996): Active site mutations define the pathway for the cooperative activation of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* 35:2934.
182. JP Herman, CM Dolgas, D Rucker, and MC Langub, Jr. (1996): Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol.* 369:165.
183. F Hofmann, W Dostmann, A Keilbach, W Landgraf, and P Ruth (1992): Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 1135:51.
184. F Hofmann, A Ammendola, and J Schlossmann (2000): Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci.* 113 (Pt 10):1671.
185. N Hogg (2002): The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 42:585.
186. NB Holderith, R Shigemoto, and Z Nusser (2003): Cell type-dependent expression of HCN1 in the main olfactory bulb. *Eur J Neurosci.* 18:344.
187. C Hölscher, L McGlinchey, R Anwyl, and MJ Rowan (1996): 7-Nitro indazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor in vivo, impairs spatial learning in the rat. *Learn Mem.* 2:267.
188. BT Hope, GJ Michael, KM Knigge, and SR Vincent (1991): Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 88:2811.
189. DA Hopkins, HW Steinbusch, M Markerink-Van Ittersum, and J de Vente (1996): Nitric oxide synthase, cGMP, and NO-mediated cGMP production in the olfactory bulb of the rat. *J Comp Neurol.* 375:641.
190. MD Houslay and G Milligan (1997): Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem.Sci.* 22:217.
191. MD Houslay, M Sullivan, and GB Bolger (1998): The multienzyme PDE4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase family: intracellular targeting, regulation, and selective inhibition by compounds exerting anti-inflammatory and antidepressant actions. *Adv Pharmacol.* 44:225.

192. MD Houslay (2001): PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 69:249.
193. MD Houslay and DR Adams (2003): PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J.* 370:1.
194. MD Houslay, P Schafer, and KY Zhang (2005): Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov. Today* 10:1503.
195. AY Hsia, JD Vincent, and PM Lledo (1999): Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb. *J Neurophysiol.* 82:1082.
196. LJ Ignarro (1990): Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol Toxicol.* 67:1.
197. DK Ingram, EL Spangler, RC Meyer, and ED London (1998): Learning in a 14-unit T-maze is impaired in rats following systemic treatment with N omega-nitro-L-arginine. *Eur J Pharmacol.* 341:1.
198. JS Isaacson and BW Strowbridge (1998): Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. *Neuron* 20:749.
199. Y Ishida, R Yamamoto, and Y Mitsuyama (1994): Effects of L- and D-enantiomers of N omega-nitro-arginine on NMDA-evoked striatal dopamine overflow. *Brain Res.Bull.* 34:483.
200. TM Ishii, M Takano, LH Xie, A Noma, and H Ohmori (1999): Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem.* 274:12835.
201. LA Izquierdo, M Vianna, DM Barros, Mello e Souza, P Ardenghi, MK Sant' Anna, C Rodrigues, JH Medinam, and I Izquierdo (2000): Short- and long-term memory are differentially affected by metabolic inhibitors given into hippocampus and entorhinal cortex. *Neurobiol Learn Mem.* 73:141.
202. A Jackowski, JG Parnavelas, and AR Lieberman (1978): The reciprocal synapse in the external plexiform layer of the mammalian olfactory bulb. *Brain Res.* 159:17.
203. SR Jaffrey, H Erdjument-Bromage, CD Ferris, P Tempst, and SH Snyder (2001): Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol.* 3:193.
204. BA Johnson and M Leon (1996): Spatial distribution of [14C]2-deoxyglucose uptake in the glomerular layer of the rat olfactory bulb following early odor preference learning. *J Comp Neurol.* 376:557.
205. JA Joseph, R Villalobos-Molina, N Denisova, S Erat, R Cutler, and J Strain (1996): Age differences in sensitivity to. *Free Radic Biol Med.* 20:821.
206. DM Julifs, S Soderling, F Burns, and JA Beavo (1999): Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 135:67.
207. S Jurado, J Sanchez-Prieto, and M Torres (2004): Elements of the nitric oxide/cGMP pathway expressed in cerebellar granule cells: biochemical and functional characterisation. *Neurochem Int.* 45:833.
208. S Kakuta, S Oda, M Takayanagi, and K Kishi (1998): Parvalbumin immunoreactive neurons in the main olfactory bulb of the house musk shrew, *Suncus murinus*. *Brain Behav Evol.* 52:285.
209. HJ Kasowski, H Kim, and CA Greer (1999): Compartmental organization of the olfactory bulb glomerulus. *J Comp Neurol.* 407:261.
210. UB Kaupp (1995): Family of cyclic nucleotide gated ion channels. *Curr Opin Neurobiol.* 5:434.

211. UB Kaupp, C Dzeja, S Frings, J Bendig, and V Hagen (1998): Applications of caged compounds of hydrolysis-resistant analogs of cAMP and cGMP. *Methods Enzymol.* 291:415.
212. UB Kaupp and R Seifert (2001): Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol* 63:235.
213. UB Kaupp and R Seifert (2002): Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev.* 82:769.
214. KM Kendrick, R Guevara-Guzman, RC de la, J Christensen, K Ostergaard, and PC Emson (1996): NMDA and kainate-evoked release of nitric oxide and classical transmitters in the rat striatum: in vivo evidence that nitric oxide may play a neuroprotective role. *Eur J Neurosci.* 8:2619.
215. KM Kendrick, R Guevara-Guzman, J Zorrilla, MR Hinton, KD Broad, M Mimmack, and S Ohkura (1997): Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature* 388:670.
216. S Khavandgar, H Homayoun, and MR Zarrindast (2003): The effect of L-NAME and L-arginine on impairment of memory formation and state-dependent learning induced by morphine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 167:291.
217. PC Kind and PE Neumann (2001): Plasticity: downstream of glutamate. *Trends Neurosci.* 24: 553.
218. PA Kingston, F Zufall, and CJ Barnstable (1996): Rat hippocampal neurons express genes for both rod retinal and olfactory cyclic nucleotide-gated channels: novel targets for cAMP/cGMP function. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93:10440.
219. PA Kingston, F Zufall, and CJ Barnstable (1999): Widespread expression of olfactory cyclic nucleotide-gated channel genes in rat brain: implications for neuronal signalling. *Synapse* 32:1.
220. JP Kiss, EC Hennings, G Zsilla, and ES Vizi (1999): A possible role of nitric oxide in the regulation of dopamine transporter function in the striatum. *Neurochem Int.* 34:345.
221. JP Kiss (2000): Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res.Bull.* 52:459.
222. JP Kiss and ES Vizi (2001): Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci.* 24:211.
223. T Kleppisch, W Wolfsgruber, S Feil, R Allmann, CT Wotjak, S Goebbels, KA Nave, F Hofmann, and R Feil (2003): Hippocampal cGMP-dependent protein kinase I supports an age- and protein synthesis-dependent component of long-term potentiation but is not essential for spatial reference and contextual memory. *J Neurosci.* 23:6005.
224. F Ko, P Seeman, WS Sun, and S Kapur (2002): Dopamine D2 receptors internalize in their low-affinity state. *Neuroreport* 13:1017.
225. H Komuro and T Kumada (2005): Ca²⁺ transients control CNS neuronal migration. *Cell Calcium* 37:387.
226. K Kosaka, CW Heizmann, and T Kosaka (1994): Calcium-binding protein parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat olfactory bulb. 1. Distribution and structural features in adult rat. *Exp Brain Res.* 99:191.
227. K Kosaka, Y Aika, K Toida, CW Heizmann, W Hunziker, DM Jacobowitz, I Nagatsu, P Streit, TJ Visser, and T Kosaka (1995): Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. *Neurosci Res.* 23:73.
228. K Kosaka, K Toida, FL Margolis, and T Kosaka (1997): Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb--II. Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals. *Neuroscience* 76:775.

229. K Kosaka, K Toida, Y Aika, and T Kosaka (1998): How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res.* 30:101.
230. K Kosaka and T Kosaka (2005): synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anat.Sci.Int.* 80:80.
231. K Kosaka, H Kunzle, and T Kosaka (2005): Organization of the main olfactory bulb of lesser hedgehog tenrecs. *Neurosci Res.* 53:353.
232. T Kosaka, K Kosaka, CW Heizmann, I Nagatsu, JY Wu, N Yanaihara, and K Hama (1987): An aspect of the organization of the GABAergic system in the rat main olfactory bulb: laminar distribution of immunohistochemically defined subpopulations of GABAergic neurons. *Brain Res.* 411:373.
233. T Kosaka and K Kosaka (2005): Structural organization of the glomerulus in the main olfactory bulb. *Chem Senses* 30 Suppl 1:i107.
234. NL Koster, AB Norman, NM Richtand, WT Nickell, AC Puche, SK Pixley, and MT Shipley (1999): Olfactory receptor neurons express D2 dopamine receptors. *J Comp Neurol.* 411:666.
235. J Kotera, N Yanaka, K Fujishige, Y Imai, H Akatsuka, T Ishizuka, K Kawashima, and K Omori (1997): Expression of rat cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase mRNA in Purkinje cell layers during postnatal neuronal development. *Eur J Biochem.* 249:434.
236. J Kotera, K Fujishige, and K Omori (2000): Immunohistochemical localization of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in rat tissues. *J Histochem Cytochem.* 48:685.
237. MM Kraus and H Prast (2002): Involvement of nitric oxide, cyclic GMP and phosphodiesterase 5 in excitatory amino acid and GABA release in the nucleus accumbens evoked by activation of the hippocampal fimbria. *Neuroscience* 112:331.
238. EG Krebs and JA Beavo (1979): Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem.* 48:923.
239. TL Krukoff (1999): Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Brain Res Rev.* 30:52.
240. JS Krumenacker, KA Hanafy, and F Murad (2004): Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res.Bull.* 62:505.
241. T Kumada and H Komuro (2004): Completion of neuronal migration regulated by loss of Ca(2+) transients. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101:8479.
242. JF Kuo and P Greengard (1969): Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. IV. Widespread occurrence of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 64:1349.
243. JF Kuo (1975): Changes in relative levels of guanosine-3':5'-monophosphate-dependent and adenosine-3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in lung, heart, and brain of developing guinea pigs. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 72:2256.
244. K Kuriyama and S Ohkuma (1995): Role of nitric oxide in central synaptic transmission: effects on neurotransmitter release. *Jpn J Pharmacol.* 69:1.
245. A Kytzia, HG Korth, H de Groot, and M Kirsch (2006): Catecholamine-induced release of nitric oxide from N-nitrosotryptophan derivatives: a non-enzymatic method for catecholamine oxidation. *Org Biomol Chem.* 4:257.
246. JR Lancaster, Jr. (1997): A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide.* 1:18.

247. HM Lander, JS Ogiste, SF Pearce, R Levi, and A Novogrodsky (1995): Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J Biol Chem.* 270:7017.
248. HM Lander, AT Jacovina, RJ Davis, and JM Tauras (1996): Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J Biol Chem.* 271:19705.
249. HM Lander, DP Hajjar, BL Hempstead, UA Mirza, BT Chait, S Campbell, and LA Quilliam (1997): A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J Biol Chem.* 272:4323.
250. RJ Lang and MJ Watson (1998): Effects of nitric oxide donors, S-nitroso-L-cysteine and sodium nitroprusside, on the whole-cell and single channel currents in single myocytes of the guinea-pig proximal colon. *Br J Pharmacol.* 123:505.
251. SZ Lei, ZH Pan, SK Aggarwal, HS Chen, J Hartman, NJ Sucher, and SA Lipton (1992): Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron* 8:1087.
252. T Leinders-Zufall, H Rosenboom, CJ Barnstable, GM Shepherd, and F Zufall (1995): A calcium-permeable cGMP-activated cation conductance in hippocampal neurons. *Neuroreport* 6:1761.
253. T Leinders-Zufall, GM Shepherd, and F Zufall (1996): Modulation by cyclic GMP of the odour sensitivity of vertebrate olfactory receptor cells. *Proc Biol Sci.* 263:803.
254. T Leinders-Zufall, MN Rand, GM Shepherd, CA Greer, and F Zufall (1997): Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics. *J Neurosci.* 17:4136.
255. AI Levey, SM Hersch, DB Rye, RK Sunahara, HB Niznik, CA Kitt, DL Price, R Maggio, MR Brann, BJ Ciliax, and . (1993): Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90:8861.
256. CG Li and MJ Rand (1989a): Evidence for a role of nitric oxide in the neurotransmitter system mediating relaxation of the rat anococcygeus muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 16:933.
257. CG Li and MJ Rand (1989b): Prejunctional inhibition of non-adrenergic non-cholinergic transmission in the rat anococcygeus muscle. *Eur J Pharmacol.* 168:107.
258. Z Li, MW Chapleau, JN Bates, K Bielefeldt, HC Lee, and FM Abboud (1998): Nitric oxide as an autocrine regulator of sodium currents in baroreceptor neurons. *Neuron* 20:1039.
259. LP Liang and S Kaufman (1998): The regulation of dopamine release from striatum slices by tetrahydrobiopterin and L-arginine-derived nitric oxide. *Brain Res.* 800:181.
260. AM Lin, LS Kao, and CY Chai (1995): Involvement of nitric oxide in dopaminergic transmission in rat striatum: an in vivo electrochemical study. *J Neurochem.* 65:2043.
261. SA Lipton, YB Choi, ZH Pan, SZ Lei, HS Chen, NJ Sucher, J Loscalzo, DJ Singel, and JS Stamler (1993): A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364:626.
262. SA Lipton and JS Stamler (1994): Actions of redox-related congeners of nitric oxide at the NMDA receptor. *Neuropharmacology* 33:1229.
263. SA Lipton, PV Rayudu, YB Choi, NJ Sucher, and HS Chen (1998): Redox modulation of the NMDA receptor by NO-related species. *Prog.Brain Res.* 118:73.
264. SA Lipton (1999): Redox sensitivity of NMDA receptors. *Methods Mol.Biol.* 128:121.

265. DT Liu, GR Tibbs, and SA Siegelbaum (1996): Subunit stoichiometry of cyclic nucleotide-gated channels and effects of subunit order on channel function. *Neuron* 16:983.
266. WL Liu and MT Shipley (1994): Intrabulbar associational system in the rat olfactory bulb comprises cholecystinin-containing tufted cells that synapse onto the dendrites of GABAergic granule cells. *J Comp Neurol.* 346:541.
267. SM Lohmann, U Walter, PE Miller, P Greengard, and P De Camilli (1981): Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 78:653.
268. SM Lohmann, AB Vaandrager, A Smolenski, U Walter, and HR De Jonge (1997): Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem.Sci.* 22:307.
269. C Lois, JM García-Verdugo, and A Álvarez-Buylla (1996): Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978.
270. G Lonart, KL Cassels, and KM Johnson (1993): Nitric oxide induces calcium-dependent [3H]dopamine release from striatal slices. *J Neurosci Res.* 35:192.
271. L López-Mascaraque, JA De Carlos, and F Valverde (1986): Structure of the olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*): description of cell types in the granular layer. *J Comp Neurol.* 253:135.
272. A Lorincz, T Notomi, G Tamas, R Shigemoto, and Z Nusser (2002): Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites. *Nat Neurosci.* 5:1185.
273. DS Lorrain and EM Hull (1993): Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. *Neuroreport* 5:87.
274. K Loughney, TR Hill, VA Florio, L Uher, GJ Rosman, SL Wolda, BA Jones, ML Howard, LM McAllister-Lucas, WK Sonnenburg, SH Francis, JD Corbin, JA Beavo, and K Ferguson (1998): Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 216:139.
275. A Ludwig, X Zong, M Jeglitsch, F Hofmann, and M Biel (1998): A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393:587.
276. A Ludwig, X Zong, F Hofmann, and M Biel (1999): Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol Biochem.* 9:179.
277. C Lugnier (2006): Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol.Ther.* 109:366.
278. F Macrides and SP Schneider (1982): Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster. *J Comp Neurol.* 208:419.
279. CR Magalhaes, RE Socodato, and R Paes-de-Carvalho (2006): Nitric oxide regulates the proliferation of chick embryo retina cells by a cyclic GMP-independent mechanism. *Int.J.Dev.Neurosci.* 24:53.
280. JB Mannick, JS Stamler, E Teng, N Simpson, J Lawrence, J Jordan, and RW Finberg (1999): Nitric oxide modulates HIV-1 replication. *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 22:1.
281. JB Mannick and CM Schonhoff (2002): Nitrosylation: the next phosphorylation? *Arch.Biochem.Biophys.* 408:1.
282. A Mansour, JH Meador-Woodruff, JR Bunzow, O Civelli, H Akil, and SJ Watson (1990): Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *J Neurosci.* 10:2587.

283. A Mansour, JH Meador-Woodruff, JR Bunzow, O Civelli, H Akil, and SJ Watson (1990): Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *J Neurosci.* 10:2587.
284. A Martínez-Ruiz and S Lamas (2004): S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc Res.* 62:43.
285. ER Matarredona, M Murillo-Carretero, B Moreno-López, and C Estrada (2004): Nitric oxide synthesis inhibition increases proliferation of neural precursors isolated from the postnatal mouse subventricular zone. *Brain Res.* 995:274.
286. ER Matarredona, M Murillo-Carretero, B Moreno-López, and C Estrada (2005): Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. *Brain Res Brain Res Rev.* 49:355.
287. LM McAllister-Lucas, WK Sonnenburg, A Kadlecsek, D Seger, HL Trong, JL Colbran, MK Thomas, KA Walsh, SH Francis, JD Corbin, and . (1993): The structure of a bovine lung cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase deduced from a cDNA clone. *J Biol Chem.* 268:22863.
288. JH McLean and MT Shipley (1987): Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: I. Origins and laminar specificity of serotonergic inputs in the adult rat. *J Neurosci.* 7:3016.
289. JH McLean, MT Shipley, WT Nickell, G Aston-Jones, and CK Reyher (1989): Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *J Comp Neurol.* 285:339.
290. BP Menco (1984): Ciliated and microvillous structures of rat olfactory and nasal respiratory epithelia. A study using ultra-rapid cryo-fixation followed by freeze-substitution or freeze-etching. *Cell Tissue Res.* 235:225.
291. G Mengod, MI Martínez-Mir, MT Vilaro, and JM Palacios (1989): Localization of the mRNA for the dopamine D2 receptor in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 86:8560.
292. MR Meyer, A Angele, E Kremmer, UB Kaupp, and F Muller (2000): A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97:10595.
293. S Michalakakis, H Geiger, S Haverkamp, F Hofmann, A Gerstner, and M Biel (2005): Impaired opsin targeting and cone photoreceptor migration in the retina of mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNGA3. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 46:1516.
294. UA Mirza, BT Chait, and HM Lander (1995): Monitoring reactions of nitric oxide with peptides and proteins by electrospray ionization-mass spectrometry. *J Biol Chem.* 270:17185.
295. J Mogensen, G Wortwein, B Gustafson, and P Ermens (1995): L-nitroarginine reduces hippocampal mediation of place learning in the rat. *Neurobiol Learn Mem.* 64:17.
296. S Moncada, RM Palmer, and EA Higgs (1991): Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109.
297. S Moncada and A Higgs (1993): The L-arginine-nitric oxide pathway. *N.Engl.J.Med.* 329:2002.
298. PR Montague, CD Gancayco, MJ Winn, RB Marchase, and MJ Friedlander (1994): Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 263:973.
299. LM Monteggia, AJ Eisch, MD Tang, LK Kaczmarek, and EJ Nestler (2000): Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 81:129.

300. S Moosmang, M Biel, F Hofmann, and A Ludwig (1999): Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol.Chem.* 380:975.
301. S Moosmang, J Stieber, X Zong, M Biel, F Hofmann, and A Ludwig (2001): Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem.* 268:1646.
302. B Moreno-López, C Romero-Grimaldi, JA Noval, M Murillo-Carretero, ER Matarredona, and C Estrada (2004): Nitric oxide is a physiological inhibitor of neurogenesis in the adult mouse subventricular zone and olfactory bulb. *J Neurosci.* 24:85.
303. K Mori, K Kishi, and H Ojima (1983): Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 219:339.
304. F Muller, A Scholten, E Ivanova, S Haverkamp, E Kremmer, and UB Kaupp (2003): HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *Eur J Neurosci.* 17:2084.
305. F Mullershausen, A Friebe, R Feil, WJ Thompson, F Hofmann, and D Koesling (2003): Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. *J Cell Biol.* 160:719.
306. F Murad (1994): Cyclic GMP: synthesis, metabolism, and function. Introduction and some historical comments. *Adv Pharmacol.* 26:1.
307. F Murad (2004): Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci.Rep.* 24:452.
308. GJ Murphy and JS Isaacson (2003): Presynaptic cyclic nucleotide-gated ion channels modulate neurotransmission in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 37:639.
309. KS Murthy (2001): Activation of phosphodiesterase 5 and inhibition of guanylate cyclase by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle. *Biochem J.* 360:199.
310. J Nácher, C Crespo, and BS McEwen (2001): Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur J Neurosci.* 14:629.
311. T Nakamura and GH Gold (1987): A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325:442.
312. AJ Nappi and E Vass (2001): The effects of nitric oxide on the oxidations of l-dopa and dopamine mediated by tyrosinase and peroxidase. *J Biol Chem.* 276:11214.
313. EJ Nelson, J Connolly, and P McArthur (2003): Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. *Biol.Cell* 95:3.
314. EA Newman (2003): Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci.* 23:1659.
315. WT Nickell, AB Norman, LM Wyatt, and MT Shipley (1991): Olfactory bulb DA receptors may be located on terminals of the olfactory nerve. *Neuroreport* 2:9.
316. Y Noda, K Yamada, and T Nabeshima (1997): Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats. *Behav Brain Res.* 83:153.
317. T Notomi and R Shigemoto (2004): Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol.* 471:241.
318. MD Nyby, MT Hori, B Ormsby, A Gabrielian, and ML Tuck (2003): Eicosapentaenoic acid inhibits Ca²⁺ mobilization and PKC activity in vascular smooth muscle cells. *Am.J.Hypertens.* 16:708.

319. TG Ohm, H Muller, and E Braak (1991): Calbindin-D-28k-like immunoreactive structures in the olfactory bulb and anterior olfactory nucleus of the human adult: distribution and cell typology--partial complementarity with parvalbumin. *Neuroscience* 42:823.
320. M Ohno, T Yamamoto, and S Watanabe (1993): Deficits in working memory following inhibition of hippocampal nitric oxide synthesis in the rat. *Brain Res.* 632:36.
321. M Ohno, I Arai, and S Watanabe (1995): N-methyl-D-aspartate stimulates dopamine release through nitric oxide formation in the nucleus accumbens of rats. *Brain Res.* 699:332.
322. D Okada and S Asakawa (2002): Allosteric activation of cGMP-specific, cGMP-binding phosphodiesterase (PDE5) by cGMP. *Biochemistry* 41:9672.
323. E Orona, JW Scott, and EC 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.
324. E Orona, EC Rainer, and JW Scott (1984): Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 226:346.
325. S Orstavik, V Natarajan, K Tasken, T Jahnsen, and M Sandberg (1997): Characterization of the human gene encoding the type I alpha and type I beta cGMP-dependent protein kinase (PRKG1). *Genomics* 42:311.
326. MA Ortega and dA Amaya Aleixandre (2000): Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. *Pharmacol.Res.* 42:421.
327. MA Packer, Y Stasiv, A Benraiss, E Chmielnicki, A Grinberg, H Westphal, SA Goldman, and G Enikolopov (2003): Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100:9566.
328. JM Palacios, DL Niehoff, and MJ Kuhar (1981): [3H]Spiperone binding sites in brain: autoradiographic localization of multiple receptors. *Brain Res.* 213:277.
329. P Panzanelli, GE Homanics, OP Ottersen, JM Fritschy, and M Sassoe-Pognetto (2004): Pre- and postsynaptic GABA receptors at reciprocal dendrodendritic synapses in the olfactory bulb. *Eur J Neurosci.* 20:2945.
330. V Parpura, TA Basarsky, F Liu, K Jeftinija, S Jeftinija, and PG Haydon (1994): Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744.
331. I Pérez-Mato, C Castro, FA Ruiz, FJ Corrales, and JM Mato (1999): Methionine adenosyltransferase S-nitrosylation is regulated by the basic and acidic amino acids surrounding the target thiol. *J Biol Chem.* 274:17075.
332. A Pfeifer, A Aszodi, U Seidler, P Ruth, F Hofmann, and R Fassler (1996): Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science* 274:2082.
333. D Pietraforte, C Mallozzi, G Scorza, and M Minetti (1995): Role of thiols in the targeting of S-nitroso thiols to red blood cells. *Biochemistry* 34:7177.
334. S Pifferi, A Boccaccio, and A Menini (2006): Cyclic nucleotide-gated ion channels in sensory transduction. *FEBS Lett.* 580:2853.
335. AJ Pinching and TP Powell (1971a): The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J Cell Sci.* 9:347.
336. AJ Pinching and TP Powell (1971b): The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci.* 9:305.

337. N Pitsikas, AE Rigamonti, SG Cella, and EE Muller (2002): Effects of the nitric oxide donor molsidomine on different memory components as assessed in the object-recognition task in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 162:239.
338. F Polleux, T Morrow, and A Ghosh (2000): Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404:567.
339. MA Pombal, MC de Arriba, C Sampedro, R Álvarez, and M Megias (2002): Immunocytochemical localization of calretinin in the olfactory system of the adult lamprey, *Lampetra fluviatilis*. *Brain Res.Bull.* 57:281.
340. MA Prendergast, JJ Buccafusco, and AV Terry, Jr. (1997): Nitric oxide synthase inhibition impairs spatial navigation learning and induces conditioned taste aversion. *Pharmacol Biochem Behav.* 57:347.
341. MA Prendergast, AV Terry, Jr., WJ Jackson, and JJ Buccafusco (1997): Nitric oxide synthase inhibition impairs delayed recall in mature monkeys. *Pharmacol Biochem Behav.* 56:81.
342. JL Price and TP Powell (1970a): The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci.* 7:631.
343. JL Price and TP Powell (1970b): An experimental study of the origin and the course of the centrifugal fibres to the olfactory bulb in the rat. *J.Anat.* 107:215.
344. JL Price and TP Powell (1970c): The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci.* 7:91.
345. RH Price, Jr., B Mayer, and AJ Beitz (1993): Nitric oxide synthase neurons in rat brain express more NMDA receptor mRNA than non-NOS neurons. *Neuroreport* 4:807.
346. J Prickaerts, HW Steinbusch, JF Smits, and J de Vente (1997): Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: effects of 7-nitroindazole and zaprinast. *Eur J Pharmacol.* 337:125.
347. J Prickaerts, A Sik, WC Van Staveren, G Koopmans, HW Steinbusch, FJ van der Staay, J de Vente, and A Blokland (2004): Phosphodiesterase type 5 inhibition improves early memory consolidation of object information. *Neurochem Int.* 45:915.
348. M Puopolo and O Belluzzi (1998): Functional heterogeneity of periglomerular cells in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci.* 10:1073.
349. Y Qian, DS Chao, DR Santillano, TL Cornwell, AC Nairn, P Greengard, TM Lincoln, and DS Bredt (1996): cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons. *J Neurosci.* 16:3130.
350. M Qiang, YC Chen, R Wang, FM Wu, and JT Qiao (1997): Nitric oxide is involved in the formation of learning and memory in rats: studies using passive avoidance response and Morris water maze task. *Behav Pharmacol.* 8:183.
351. M Qiang, J Xie, H Wang, and J Qiao (1999): Effect of nitric oxide synthesis inhibition on c-Fos expression in hippocampus and cerebral cortex following two forms of learning in rats: an immunohistochemistry study. *Behav Pharmacol.* 10:215.
352. E Racekova, J Orendacova, M Martoncikova, and I Vanicky (2003): NADPH-diaphorase positivity in the rostral migratory stream of the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 146:131.
353. E Racekova, M Martoncikova, B Mitruskova, D Cizkova, and J Orendacova (2005): Age-related changes of NADPH-diaphorase positivity in the rat rostral migratory stream. *Cell Mol Neurobiol.* 25:1093.

354. Rafikova, R Rafikov, and E Nudler (2002): Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99:5913.
355. A Ramón-Cueto and J Ávila (1998): Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res.Bull.* 46:175.
356. A Reif, A Schmitt, S Fritzen, S Chourbaji, C Bartsch, A Urani, M Wycislo, R Mossner, C Sommer, P Gass, and KP Lesch (2004): Differential effect of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) on the regulation of adult neurogenesis and behaviour. *Eur J Neurosci.* 20:885.
357. G Reiser (1990a): Mechanism of stimulation of cyclic-GMP level in a neuronal cell line mediated by serotonin (5-HT₃) receptors. Involvement of nitric oxide, arachidonic-acid metabolism and cytosolic Ca²⁺. *Eur J Biochem.* 189:547.
358. G Reiser (1990b): Endothelin and a Ca²⁺ ionophore raise cyclic GMP levels in a neuronal cell line via formation of nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 101:722.
359. DR Repaske, JG Corbin, M Conti, and MF Goy (1993): A cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase gene is highly expressed in the limbic system of the rat brain. *Neuroscience* 56:673.
360. M Revermann, E Maronde, P Ruth, and HW Korf (2002): Protein kinase G I immunoreaction is colocalized with arginine-vasopressin immunoreaction in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett.* 334:119.
361. MJ Richards and SE Gordon (2000): Cooperativity and cooperation in cyclic nucleotide-gated ion channels. *Biochemistry* 39:14003.
362. F Rieke and EA Schwartz (1994): A cGMP-gated current can control exocytosis at cone synapses. *Neuron* 13:863.
363. RA Robbins and MB Grisham (1997): Nitric oxide. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 29:857.
364. RB Robinson and SA Siegelbaum (2003): Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* 65:453.
365. JH Rogers (1992): Immunohistochemical markers in rat brain: colocalization of calretinin and calbindin-D28k with tyrosine hydroxylase. *Brain Res.* 587:203.
366. C Romero-Grimaldi, G Gheusi, PM Lledo, and C Estrada (2006): Chronic inhibition of nitric oxide synthesis enhances both subventricular zone neurogenesis and olfactory learning in adult mice. *Eur J Neurosci.* 24:2461.
367. T Rosenbaum and SE Gordon (2004): Quickening the pace: looking into the heart of HCN channels. *Neuron* 42:193.
368. JP Royet, H Distel, R Hudson, and R Gervais (1998): A re-estimation of the number of glomeruli and mitral cells in the olfactory bulb of rabbit. *Brain Res.* 788:35.
369. M Russwurm and D Koesling (2002): Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Cell Biochem.* 230:159.
370. SD Rybalkin, IG Rybalkina, R Feil, F Hofmann, and JA Beavo (2002): Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 277:3310.
371. A Saghatelyan, A Carleton, S Lagier, A de Chevigny, and PM Lledo (2003): Local neurons play key roles in the mammalian olfactory bulb. *J.Physiol Paris* 97:517.
372. DR Samanta Roy and CJ Barnstable (1999): Temporal and spatial pattern of expression of cyclic nucleotide-gated channels in developing rat visual cortex. *Cereb.Cortex* 9:340.

373. B Santoro, SG Grant, D Bartsch, and ER Kandel (1997): Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94:14815.
374. B Santoro, DT Liu, H Yao, D Bartsch, ER Kandel, SA Siegelbaum, and GR Tibbs (1998): Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93:717.
375. B Santoro, S Chen, A Luthi, P Pavlidis, GP Shumyatsky, GR Tibbs, and SA Siegelbaum (2000): Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci.* 20:5264.
376. J Schachtner, U Homberg, and JW Truman (1999): Regulation of cyclic GMP elevation in the developing antennal lobe of the Sphinx moth, *Manduca sexta*. *J Neurobiol.* 41:359.
377. HH Schmidt, SM Lohmann, and U Walter (1993): The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1178:153.
378. SP Schneider and F Macrides (1978): Laminal distributions of interneurons in the main olfactory bulb of the adult hamster. *Brain Res.Bull.* 3:73.
379. TA Schoenfeld and F Macrides (1984): Topographic organization of connections between the main olfactory bulb and pars externa of the anterior olfactory nucleus in the hamster. *J Comp Neurol.* 227:121.
380. TA Schoenfeld, JE Marchand, and F Macrides (1985): Topographic organization of tufted cell axonal projections in the hamster main olfactory bulb: an intrabulbar associational system. *J Comp Neurol.* 235:503.
381. NL Scholz and JW Truman (2000): Invertebrate models for studying NO-mediated signaling. En "Functional neuroanatomy of nitric oxide system". Elsevier.
382. NL Scholz, J de Vente, JW Truman, and K Graubard (2001): Neural network partitioning by NO and cGMP. *J Neurosci.* 21:1610.
383. NE Schoppa and NN Urban (2003): Dendritic processing within olfactory bulb circuits. *Trends Neurosci.* 26:501.
384. DE Scott, W Wu, J Slusser, A Depto, and S Hansen (1995): Neural regeneration and neuronal migration following injury. I. The endocrine hypothalamus and neurohypophyseal system. *Exp.Neurol.* 131:23.
385. DE Scott and SL Hansen (1997): Post-traumatic regeneration, neurogenesis and neuronal migration in the adult mammalian brain. *Va.Med.Q.* 124:249.
386. JW Scott (1986): The olfactory bulb and central pathways. *Experientia* 42:223.
387. JW Scott, JK McDonald, and JL Pemberton (1987): Short axon cells of the rat olfactory bulb display NADPH-diaphorase activity, neuropeptide Y-like immunoreactivity, and somatostatin-like immunoreactivity. *J Comp Neurol.* 260:378.
388. JW Scott (1987): Organization of olfactory bulb output cells and their local circuits. *Ann N Y Acad Sci.* 510:44.
389. I Segev (1999): Taming time in the olfactory bulb. *Nat Neurosci.* 2:1041.
390. G Segovia and F Mora (1998): Role of nitric oxide in modulating the release of dopamine, glutamate, and GABA in striatum of the freely moving rat. *Brain Res.Bull.* 45:275.

391. R Seifert, A Scholten, R Gauss, A Mincheva, P Lichter, and UB Kaupp (1999): Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96:9391.
392. A Seilicovich, M Lasaga, M Befumo, BH Duvilanski, DM del Carmen, V Rettori, and SM McCann (1995): Nitric oxide inhibits the release of norepinephrine and dopamine from the medial basal hypothalamus of the rat. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 92:11299.
393. JM Sequier, W Hunziker, C Andressen, and MR Celio (1990): Calbindin D-28k Protein and mRNA Localization in the Rat Brain. *Eur J Neurosci.* 2:1118.
394. K Seroogy, T Hokfelt, A Buchan, JC Brown, L Terenius, AW Norman, and M Goldstein (1989): Somatostatin-like immunoreactivity in rat main olfactory bulb: extent of coexistence with neuropeptide Y-, tyrosine hydroxylase- and vitamin D-dependent calcium binding protein-like immunoreactivities. *Brain Res.* 496:389.
395. GM Shepherd (1972): Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev.* 52:864.
396. GM Shepherd, CA Greer (1998): Olfactory Bulb en "The synaptic organization of the brain." Oxford UP, ed., New York, 159.
397. GM Shepherd, WR Chen, D Willhite, M Migliore, and CA Greer (2007): The olfactory granule cell: From classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain Res Rev.*
398. M Shibata, N Araki, K Ohta, J Hamada, K Shimazu, and Y Fukuuchi (1996): Nitric oxide regulates NMDA-induced dopamine release in rat striatum. *Neuroreport* 7:605.
399. MT Shipley and GD Adamek (1984): The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Res.Bull.* 12:669.
400. MT Shipley and M Ennis (1996): Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol.* 30:123.
401. MT Shipley, M Ennis and AC Puche (2004): Olfactory System in "The rat nervous system".
402. A Smolenski, AM Burkhardt, M Eigenthaler, E Butt, S Gambaryan, SM Lohmann, and U Walter (1998): Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 358:134.
403. J Snellman and S Nawy (2004): cGMP-dependent kinase regulates response sensitivity of the mouse on bipolar cell. *J Neurosci.* 24:6621.
404. SH Snyder (1992): Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* 257:494.
405. SH Soderling, SJ Bayuga, and JA Beavo (1998): Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem.* 273:15553.
406. SH Soderling and JA Beavo (2000): Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol.* 12:174.
407. LS Sorkin (1993): NMDA evokes an L-NAME sensitive spinal release of glutamate and citrulline. *Neuroreport* 4:479.
408. JS Stamler, DI Simon, JA Osborne, ME Mullins, O Jaraki, T Michel, DJ Singel, and J Loscalzo (1992): S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89:444.
409. JS Stamler (1994): Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78:931.

410. JS Stamler, EJ Toone, SA Lipton, and NJ Sucher (1997): (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron* 18:691.
411. JS Stamler, S Lamas, and FC Fang (2001): Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106:675.
412. TL Stewart, AD Michel, MD Black, and PP Humphrey (1996): Evidence that nitric oxide causes calcium-independent release of [3H] dopamine from rat striatum in vitro. *J Neurochem.* 66:131.
413. AK Stout and JJ Woodward (1994): Differential effects of nitric oxide gas and nitric oxide donors on depolarization-induced release of [3H]norepinephrine from rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 33:1367.
414. A Strasser, RM McCarron, H Ishii, D Stanimirovic, and M Spatz (1994): L-arginine induces dopamine release from the striatum in vivo. *Neuroreport* 5:2298.
415. PJ Stribos, GD Pratt, S Khan, IG Charles, and J Garthwaite (1999): Molecular characterization and in situ localization of a full-length cyclic nucleotide-gated channel in rat brain. *Eur J Neurosci.* 11:4463.
416. C Sumners and W Tang (1992): Atrial natriuretic peptide receptor subtypes in rat neuronal and astrocyte glial cultures. *Am J Physiol* 262:C1134.
417. J Sun, C Xin, JP Eu, JS Stamler, and G Meissner (2001): Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98:11158.
418. Y Sun, K Jin, JT Childs, L Xie, XO Mao, and DA Greenberg (2005): Neuronal nitric oxide synthase and ischemia-induced neurogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:485.
419. M Tanaka, S Yoshida, M Yano, and F Hanaoka (1994): Roles of endogenous nitric oxide in cerebellar cortical development in slice cultures. *Neuroreport* 5:2049.
420. L Tao, ME Murphy, and AM English (2002): S-nitrosation of Ca(2+)-loaded and Ca(2+)-free recombinant calbindin D(28K) from human brain. *Biochemistry* 41:6185.
421. ML Tetreault, D Henry, DM Horrigan, G Matthews, and AL Zimmerman (2006): Characterization of a novel cyclic nucleotide-gated channel from zebrafish brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 348:441.
422. MK Thomas, SH Francis, and JD Corbin (1990): Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *J Biol Chem.* 265:14971.
423. MK Thomas, SH Francis, and JD Corbin (1990): Characterization of a purified bovine lung cGMP-binding cGMP phosphodiesterase. *J Biol Chem.* 265:14964.
424. SH Thompson (1997): Cyclic GMP-gated channels in a sympathetic neuron cell line. *J Gen Physiol* 110:155.
425. GR Tibbs, EH Goulding, and SA Siegelbaum (1997): Allosteric activation and tuning of ligand efficacy in cyclic-nucleotide-gated channels. *Nature* 386:612.
426. K Toida, K Kosaka, CW Heizmann, and T Kosaka (1994): Synaptic contacts between mitral/tufted cells and GABAergic neurons containing calcium-binding protein parvalbumin in the rat olfactory bulb, with special reference to reciprocal synapses between them. *Brain Res.* 650:347.
427. K Toida, K Kosaka, CW Heizmann, and T Kosaka (1996): Electron microscopic serial-sectioning/reconstruction study of parvalbumin-containing neurons in the external plexiform layer of the rat olfactory bulb. *Neuroscience* 72:449.

428. K Toida, K Kosaka, CW Heizmann, and T Kosaka (1998): Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: III. Structural features of calbindin D28K-immunoreactive neurons. *J Comp Neurol.* 392:179.
429. K Toida, K Kosaka, Y Aika, and T Kosaka (2000): Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb--IV. Intraglomerular synapses of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons. *Neuroscience* 101:11.
430. A Torroglosa, M Murillo-Carretero, C Romero-Grimaldi, ER Matarredona, A Campos-Caro, and C Estrada (2007): Nitric oxide decreases subventricular zone stem cell proliferation by inhibition of epidermal growth factor receptor and phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway. *Stem Cells* 25:88.
431. H Treloar, E Walters, F Margolis, and B Key (1996): Olfactory glomeruli are innervated by more than one distinct subset of primary sensory olfactory neurons in mice. *J Comp Neurol.* 367:550.
432. JW Truman, J de Vente, and EE Ball (1996): Nitric oxide-sensitive guanylate cyclase activity is associated with the maturational phase of neuronal development in insects. *Development* 122:3949.
433. IV Turko, SH Francis, and JD Corbin (1998): Potential roles of conserved amino acids in the catalytic domain of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem.* 273:6460.
434. IV Turko, SA Ballard, SH Francis, and JD Corbin (1999): Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds. *Mol Pharmacol.* 56:124.
435. MD Uhler (1993): Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem.* 268:13586.
436. D Umbriaco, S García, C Beaulieu, and L Descarries (1995): Relational features of acetylcholine, noradrenaline, serotonin and GABA axon terminals in the stratum radiatum of adult rat hippocampus (CA1). *Hippocampus* 5:605.
437. NN Urban (2002): Lateral inhibition in the olfactory bulb and in olfaction. *Physiol Behav.* 77:607.
438. AB Vaandrager, EM Ehlert, T Jarchau, SM Lohmann, and HR De Jonge (1996): N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II. *J Biol Chem.* 271:7025.
439. AB Vaandrager, M Edixhoven, AG Bot, MA Kroos, T Jarchau, S Lohmann, HG Genieser, and HR De Jonge (1997): Endogenous type II cGMP-dependent protein kinase exists as a dimer in membranes and can be functionally distinguished from the type I isoforms. *J Biol Chem.* 272:11816.
440. F Valverde (2003): The olfactory bulb as a model for experimental studies. *Neurologia* 18:177.
441. Van Gehuchten and I Martin (1891): Le bulbe olfactif chez quelques mammifères. *Cellule* 5. 2: 205
442. J Van der Weide, M Camps, AS Horn, and JM Palacios (1987): Autoradiographic localization of dopamine D2 receptors in the rat brain using the new agonist [3H]N-0437. *Neurosci Lett.* 83:259.
443. WC Van Staveren, HW Steinbusch, M Markerink-Van Ittersum, DR Repaske, MF Goy, J Kotera, K Otori, JA Beavo, and J de Vente (2003): mRNA expression patterns of the cGMP-hydrolyzing phosphodiesterases types 2, 5, and 9 during development of the rat brain. *J Comp Neurol.* 467:566.
444. S Van Wagenen and V Rehder (1999): Regulation of neuronal growth cone filopodia by nitric oxide. *J Neurobiol.* 39:168.

445. MD Varnum and WN Zagotta (1996): Subunit interactions in the activation of cyclic nucleotide-gated ion channels. *Biophys.J.* 70:2667.
446. MD Varnum and WN Zagotta (1997): Interdomain interactions underlying activation of cyclic nucleotide-gated channels. *Science* 278:110.
447. DV Vasilyev and ME Barish (2002): Postnatal development of the hyperpolarization-activated excitatory current Ih in mouse hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* 22:8992.
448. RM Villalba, J Rodrigo, FJ Álvarez, M Achaval, and R Martínez-Murillo (1989): Localization of C-PON immunoreactivity in the rat main olfactory bulb. Demonstration that the population of neurons containing endogenous C-PON display NADPH-diaphorase activity. *Neuroscience* 33:373.
449. SR Vincent and H Kimura (1992): Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46:755.
450. ES Vizi and E Labos (1991): Non-synaptic interactions at presynaptic level. *Prog Neurobiol.* 37:145.
451. ES Vizi (2000): Role of high-affinity receptors and membrane transporters in nonsynaptic communication and drug action in the central nervous system. *Pharmacol Rev.* 52:63.
452. C Wagner, A Pfeifer, P Ruth, F Hofmann, and A Kurtz (1998): Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest* 102:1576.
453. U Walter (1981): Distribution of cyclic-GMP-dependent protein kinase in various rat tissues and cell lines determined by a sensitive and specific radioimmunoassay. *Eur J Biochem.* 118:339.
454. U Walter (1989): Physiological role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 113:41.
455. JK Wamsley, DR Gehlert, FM Filloux, and TM Dawson (1989): Comparison of the distribution of D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat brain. *J Chem Neuroanat.* 2:119.
456. X Wang and PJ Robinson (1997): Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem.* 68:443.
457. Z Wang, PG Haydon, and ES Yeung (2000): Direct observation of calcium-independent intercellular ATP signaling in astrocytes. *Anal.Chem.* 72:2001.
458. JY Wei, DS Roy, L Leconte, and CJ Barnstable (1998): Molecular and pharmacological analysis of cyclic nucleotide-gated channel function in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 56:37.
459. AR West and MP Galloway (1996): Desensitization of 5-hydroxytryptamine-facilitated dopamine release in vivo. *Eur J Pharmacol.* 298:241.
460. AK Wiggins, PJ Shen, and AL Gundlach (2003): Atrial natriuretic peptide expression is increased in rat cerebral cortex following spreading depression: possible contribution to sd-induced neuroprotection. *Neuroscience* 118:715.
461. L Wolfe, JD Corbin, and SH Francis (1989): Characterization of a novel isozyme of cGMP-dependent protein kinase from bovine aorta. *J Biol Chem.* 264:7734.
462. J Wood and J Garthwaite (1994): Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* 33:1235.
463. HT Xu, XB Yuan, CB Guan, S Duan, CP Wu, and L Feng (2004): Calcium signaling in chemorepellant Slit2-dependent regulation of neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101:4296.
464. L Xu, JP Eu, G Meissner, and JS Stamler (1998): Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279:234.

-
465. SG Xu, C Prasad, and DE Smith (1999): Neurons exhibiting dopamine D2 receptor immunoreactivity in the substantia nigra of the mutant weaver mouse. *Neuroscience* 89:191.
466. L Xue, G Farrugia, SM Miller, CD Ferris, SH Snyder, and JH Szurszewski (2000): Carbon monoxide and nitric oxide as coneurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97:1851.
467. K Yamada, Y Noda, S Nakayama, Y Komori, H Sugihara, T Hasegawa, and T Nabeshima (1995): Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br J Pharmacol.* 115:852.
468. C Yan, JK Bentley, WK Sonnenburg, and JA Beavo (1994): Differential expression of the 61 kDa and 63 kDa calmodulin-dependent phosphodiesterases in the mouse brain. *J Neurosci.* 14:973.
469. N Yoshimura, S Seki, and WC de Groat (2001): Nitric oxide modulates Ca(2+) channels in dorsal root ganglion neurons innervating rat urinary bladder. *J Neurophysiol.* 86:304.
470. C Zhang and MT Wong-Riley (1996): Do nitric oxide synthase, NMDA receptor subunit R1 and cytochrome oxidase co-localize in the rat central nervous system? *Brain Res.* 729:205.
471. DY Zhu, SH Liu, HS Sun, and YM Lu (2003): Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus. *J Neurosci.* 23:223.
472. XJ Zhu, Y Hua, J Jiang, QG Zhou, CX Luo, X Han, YM Lu, and DY Zhu (2006): Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide inhibits neurogenesis in the adult dentate gyrus by down-regulating cyclic AMP response element binding protein phosphorylation. *Neuroscience* 141:827.
473. XZ Zhu and LG Luo (1992): Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices. *J Neurochem.* 59:932.
474. AL Zimmerman (1995): Cyclic nucleotide gated channels. *Curr Opin Neurobiol.* 5:296.
475. M Zonta, MC Angulo, S Gobbo, B Rosengarten, KA Hossmann, T Pozzan, and G Carmignoto (2003): Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci.* 6:43.
476. F Zufall, GM Shepherd, and CJ Barnstable (1997): Cyclic nucleotide gated channels as regulators of CNS development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 7:404.
477. F Zufall and T Leinders-Zufall (1997): Identification of a long-lasting form of odor adaptation that depends on the carbon Monoxide/cGMP second-messenger system. *J Neurosci.* 17:2703.
478. www.apuche.org/OIA
479. flavor.monell.org/~loweg/OlfactoryBulb.htm
480. www.sigmaaldrich.com

Anexo I.
PROCOLOS

Tinciones con azul de toluidina

Tinción de Nissl en cortes de vibratomo (apartado 4.6.1.)

	tª ambiente	Colocar las secciones de 50 µm sobre portaobjetos gelatinizados y dejar secar al aire
10'	tª ambiente	Azul de Toluidina al 0.5% en tampón acetato 0.1M pH 3.9
	tª ambiente	Diferenciar en Etanol 96°
3x1'	tª ambiente	Etanol 96°
3x1'	tª ambiente	Etanol 100°
3x1'	tª ambiente	Xilol
		Montar con Eukitt

Tinción de cortes semifinos con azul de toluidina-borax (apartado 4.6.2.)

2'	60°C	Colocar las secciones de 0.5-2 µm sobre portaobjetos gelatinizados y secar sobre placa calefactora
15"	60°C	Azul de Toluidina al 0.5% y Borax al 1%
	tª ambiente	Lavar con agua
	60°C	Secar sobre la placa calefactora
24 horas	60°C	Poner una gota de resina Durcupan, un cubreobjetos y dejar polimerizar

Detección histoquímica de la NADPH-diaforasa (apartado 4.7.)

3x15'	tª ambiente	Lavar con TT ₈₋₂₅
60'-90'	37°C	Incubación con 0.15mg/ml de NBT, 1mg/ml de β-NADPH, 0.3% Triton X-100 diluido en TT ₈₋₃₇ . Controlar la reacción al microscopio óptico.
3x15'	tª ambiente	Lavar con TT ₈₋₂₅
	tª ambiente	Montar sobre portaobjetos gelatinizados y dejar secar al aire
2'	tª ambiente	Etanol 50°
2'	tª ambiente	Etanol 70°
2'	tª ambiente	Etanol 96°
2'	tª ambiente	Etanol 100°
2'	tª ambiente	Xilol
		Montar con Eukitt

Marcajes inmunocitoquímicos simples en preinclusión

Método ABC para microscopía óptica (apartado 4.8.1.1.1.1.)

3x5'	t ^a ambiente	Lavar en TF
20'	t ^a ambiente	Borohidruro sódico al 1% en TF (preparar 30' antes de ser usado) si el tejido ha estado fijado con las soluciones de perfusión 2 o 3
4x5'	t ^a ambiente	Lavar en TF
1 hora	t ^a ambiente	Solución de bloqueo preparada en TF
24 horas	t ^a ambiente	Incubación con el anticuerpo primario diluido en solución de incubación preparada en TF
3x15'	t ^a ambiente	Lavar en TF
2 horas	t ^a ambiente	Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 en TF
3x15'	t ^a ambiente	Lavar en TF
2 horas	t ^a ambiente	Incubación con el complejo ABC diluido 1:200 en TF
3x15'	t ^a ambiente	Lavar en TF
5'-20'	t ^a ambiente	Revelado con DAB al 0.05% y H ₂ O ₂ al 0.003% en TF
4x15'	t ^a ambiente	Lavar en TF
1 hora	t ^a ambiente	Postfijación e intensificación con OsO ₄ al 1% y glucosa al 7% en TF
4x15'	t ^a ambiente	Lavar en TF
2x3'	t ^a ambiente	Etanol 30°
2x10'	t ^a ambiente	Etanol 50°
2x15'	t ^a ambiente	Etanol 70°
2x15'	t ^a ambiente	Etanol 96°
2x15'	t ^a ambiente	Etanol 100°
2x8'	t ^a ambiente	Óxido de propileno
24 horas	t ^a ambiente	Infiltrar en resina Durcupan
24 horas	60°C	Incluir en plano y polimerizar la resina

Método ABC para microscopía electrónica (apartado 4.8.1.1.1.2.)

3x5'	tª ambiente	Lavar en TF
20'	tª ambiente	Borohidruro sódico al 1% en TF (preparar 30' antes de ser usado) si el tejido ha estado fijado con las soluciones de perfusión 2 o 3
4x5'	tª ambiente	Lavar en TF
1 hora	tª ambiente	Solución crioprotectora
3 veces		Rápida congelación-descongelación en N ₂ líquido
3x10'	tª ambiente	Lavar en TF
1 hora	tª ambiente	Solución de bloqueo preparada en TF
48-72 horas	4°C	Incubación con el anticuerpo primario diluido en solución de incubación preparada en TF
3x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2 horas	tª ambiente	Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 en TF
3x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2 horas	tª ambiente	Incubación con el complejo ABC diluido 1:200 en TF
3x15'	tª ambiente	Lavar en TF
5'-20'	tª ambiente	Revelado con DAB al 0.05% y H ₂ O ₂ al 0.003% en TF
4x15'	tª ambiente	Lavar en TF
1 hora	tª ambiente	Postfijación e intensificación con OsO ₄ al 1% y glucosa al 7% en TF en oscuridad
4x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2x15'	4°C	Solución de lavado con tampón maleato
90'	4°C	Solución de coloración con acetato de uranilo
3x10'	4°C	Solución de lavado con tampón maleato
2x3'	4°C	Etanol 30°
2x10'	4°C	Etanol 50°
2x15'	4°C	Etanol 70°
2x15'	4°C	Etanol 96°
2x15'	4°C	Etanol 100°
3x15'	tª ambiente	Etanol 100° con sulfato cúprico
2x8'	tª ambiente	Óxido de propileno
24 horas	tª ambiente	Infiltrar en resina Durcupan
24 horas	60°C	Incluir en plano y polimerizar la resina

Marcaje inmunocitoquímico utilizando oro coloidal (apartado 4.8.1.1.2.)

3x5'	tª ambiente	Lavar en TF
20'	tª ambiente	Borohidruro sódico al 1% en TF (preparar 30' antes de ser usado) si el tejido ha estado fijado con las soluciones de perfusión 2 o 3
4x5'	tª ambiente	Lavar en TF
1 hora	tª ambiente	Solución crioprotectora
3 veces		Rápida congelación-descongelación en N ₂ líquido
3x10'	tª ambiente	Lavar en TF
10'	tª ambiente	Lavar en TFS
1 hora	tª ambiente	Solución de bloqueo preparada con TFS
48-72 horas	4°C	Incubación con el anticuerpo primario diluido en solución de incubación preparada con TFS
4x10'	tª ambiente	Lavar en TFS
2 horas	tª ambiente	Incubación con el anticuerpo secundario-Au (Ø 1 nm) diluido en solución de incubación preparada con TFS
24 horas	4°C	
3x5'	tª ambiente	Lavar en solución de incubación preparada con TFS
3x10'	tª ambiente	Lavar en TFS
10'	tª ambiente	Postfijación con Glutaraldehído al 2% en TFS
3x15'	tª ambiente	Lavar en TFS
4x10'	tª ambiente	Lavar con agente acondicionador diluido 1:10 en agua
15'-20'	20°C	Amplificación del oro en oscuridad y controlada en el microscopio
10'	tª ambiente	Parar la reacción con tiosulfato sódico 0.03M en agente acondicionador diluido 1:10 en agente acondicionador
4x10'	tª ambiente	Lavar con agente acondicionador diluido 1:10 en agua
3x15'	tª ambiente	Lavar en TFS
10'	tª ambiente	Lavar en TF
1 hora	tª ambiente	Postfijación e intensificación con OsO ₄ al 1% en TF en oscuridad
4x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2x3'	4°C	Etanol 30°
2x10'	4°C	Etanol 50°
2x10'	4°C	Etanol 70°
45'	4°C	Contrastado con Acetato de Uranilo al 2% en Etanol 70° en oscuridad
2x3'	4°C	Etanol 70°
2x10'	4°C	Etanol 96°
2x10'	4°C	Etanol 100°
2x10'	tª ambiente	Etanol 100° con sulfato cúprico
2x8'	tª ambiente	Óxido de propileno
24 horas	tª ambiente	Infiltrar en resina Durcupan
24 horas	60°C	Incluir en plano y polimerizar la resina

Marcaje inmunocitoquímico mediante fluorescencia (apartado 4.8.1.1.3.)

3x5'	tª ambiente	Lavar en TF
20'	tª ambiente	Borohidruro sódico al 1% en TF (preparar 30' antes de ser usado) si el tejido ha estado fijado con las soluciones de perfusión 2 o 3
4x5'	tª ambiente	Lavar en TF
5'	tª ambiente	Lavar en TFS
45'	tª ambiente	Solución bloqueo preparada en TFS
24 horas	tª ambiente	Incubación con el anticuerpo primario diluido en solución de incubación preparada en TFS
3x15'	tª ambiente	Lavar en TFS
2 horas	tª ambiente	Incubación con el anticuerpo secundario fluorescente diluido en TFS
3x15'	tª ambiente	Lavar en TFS
	tª ambiente	Montar sobre portaobjetos gelatinizados con N-propil-galeato

Marcaje inmunocitoquímico simples en postinclusión sobre secciones semifinas

(apartado 4.8.1.2.)

12'	t ^a ambiente	En una mezcla de 50% etóxido sódico, 30% acetona y 20% tolueno
2'	t ^a ambiente	Etanol 100°
2'	t ^a ambiente	Etanol 96°
2'	t ^a ambiente	Etanol 70°
2'	t ^a ambiente	Etanol 50°
2'	t ^a ambiente	Lavar con agua
5'	t ^a ambiente	Lavar con TFS
10'	t ^a ambiente	1% Metaperyodato sódico en TFS
3x10'	t ^a ambiente	Lavar con TFS
5'	t ^a ambiente	Lavar con TF
15'	t ^a ambiente	1% Borohidruro sódico en TF (si el tejido ha estado fijado con las soluciones de perfusión 2 o 3)
3x10'	t ^a ambiente	Lavar con TF
5'	t ^a ambiente	Lavar con TFS
30'	t ^a ambiente	Solución de bloqueo con 10% NGS y 0.1% Triton X-100 en TFS
3x10'	t ^a ambiente	Lavar con TFS
24 horas	t ^a ambiente	Incubación con el anticuerpo primario diluido en TFS con 1% NGS
3x10'	t ^a ambiente	Lavar con TFS
50'	t ^a ambiente	Incubación con el anticuerpo secundario biotilado diluido 1:200 en TFS
3x10'	t ^a ambiente	Lavar en TFS
45'	t ^a ambiente	Incubación con el complejo ABC diluido 1:200 en TFS
3x10'	t ^a ambiente	Lavar en TFS
5'-20'	t ^a ambiente	Revelado con DAB al 0.05% y H ₂ O ₂ al 0.003% en TF
3x10'	t ^a ambiente	Lavar en TFS
10'	t ^a ambiente	Lavar en TF
2'	t ^a ambiente	Osmificar en 1% OsO ₄ en TF
4x10'	t ^a ambiente	Lavar en TF
2'	t ^a ambiente	Etanol 50°
2'	t ^a ambiente	Etanol 70°
2'	t ^a ambiente	Etanol 96°
2'	t ^a ambiente	Etanol 100°
2'	t ^a ambiente	Xilol
		Montar con Eukitt

Marcajes inmunocitoquímicos dobles en preinclusión

Marcaje inmunohistoquímico doble con ABC y oro coloidal si los anticuerpos primarios son de distinto origen (apartado 4.8.2.1.1.)

3x5'	tª ambiente	Lavar en TF
20'	tª ambiente	Borohidruro sódico al 1% en TF (preparar 30' antes de ser usado) si el tejido ha estado fijado con las soluciones de perfusión 2 o 3
4x5'	tª ambiente	Lavar en TF
1 hora	tª ambiente	Solución crioprotectora
3 veces		Rápida congelación-descongelación en N ₂ líquido
3x10'	tª ambiente	Lavar en TF
10'	tª ambiente	Lavar en TFS
1 hora	tª ambiente	Solución de bloqueo preparada con TFS
48-72 horas	4°C	Incubación con la mezcla de los anticuerpos primarios diluidos en solución de incubación preparada con TFS
4x10'	tª ambiente	Lavar en TFS
2 horas	tª ambiente	Incubación con la mezcla de anticuerpos secundarios diluidos en solución de incubación preparada con TFS
24 horas	4°C	
3x5'	tª ambiente	Lavar en solución de incubación preparada con TFS
3x10'	tª ambiente	Lavar en TFS
10'	tª ambiente	Post-fijación en 2% Glutaraldehído en TFS
3x15'	tª ambiente	Lavar en TFS
4x10'	tª ambiente	Lavar con agente acondicionador
15'-20'	20°C	Amplificación del oro en oscuridad y controlada en el microscopio
10'	tª ambiente	Parar la reacción con tiosulfato sódico 0.03M en agente acondicionador
4x10'	tª ambiente	Lavar con agente acondicionador
3x15'	tª ambiente	Lavar en TFS
10'	tª ambiente	Lavar en TF
2 horas	tª ambiente	Incubación con el complejo ABC diluido 1:200 en TF
3x15'	tª ambiente	Lavar en TF
20'	tª ambiente	Revelado con DAB al 0.05% y H ₂ O ₂ al 0.003% en TF
4x15'	tª ambiente	Lavar en TF
1 hora	tª ambiente	Postfijación e intensificación con 1% OsO ₄ en TF en oscuridad
4x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2x3'	4°C	Etanol 30°
2x10'	4°C	Etanol 50°
2x10'	4°C	Etanol 70°
45'	4°C	Contrastado con 2% Acetato de Uranilo en Etanol 70° en oscuridad
2x3'	4°C	Etanol 70°
2x10'	4°C	Etanol 96°
2x10'	4°C	Etanol 100°
2x10'	tª ambiente	Etanol 100° con sulfato cúprico
2x8'	tª ambiente	Óxido de propileno
24 horas	tª ambiente	Infiltrar en resina Durcupan
24 horas	60°C	Incluir en plano y polimerizar la resina

Marcaje inmunohistoquímico doble con ABC y oro coloidal si los anticuerpos primarios son del mismo origen (apartado 4.8.2.1.2.)

3x5'	tª ambiente	Lavar en TF
20'	tª ambiente	Borohidruro sódico al 1% en TF (preparar 30' antes de ser usado) si el tejido ha estado fijado con las soluciones de perfusión 2 o 3
4x5'	tª ambiente	Lavar en TF
1 hora	tª ambiente	Solución crioprotectora
3 veces		Rápida congelación-descongelación en N ₂ líquido
3x10'	tª ambiente	Lavar en TF
10'	tª ambiente	Lavar en TFS
1 hora	tª ambiente	Solución de bloqueo preparada con TFS
48-72 horas	4°C	Incubación con el primer anticuerpo primario diluido en solución de incubación preparada con TFS
4x10'	tª ambiente	Lavar en TFS
2 horas	tª ambiente	Incubación con el anticuerpo secundario-Au (1 nm) diluido 1:100 en solución de incubación preparada con TFS
24 horas	4°C	
3x5'	tª ambiente	Lavar en solución de incubación preparada con TFS
3x10'	tª ambiente	Lavar en TFS
10'	tª ambiente	Post-fijación en 2% Glutaraldehído en TFS
3x15'	tª ambiente	Lavar en TFS
4x10'	tª ambiente	Lavar con agente acondicionador diluido 1:10 en agua
15'-20'	20°C	Amplificación del oro en oscuridad y controlada en el microscopio
10'	tª ambiente	Parar la reacción con tiosulfato sódico 0.03M en agente acondicionador
4x10'	tª ambiente	Lavar con agente acondicionador diluido 1:10 en agua
3x15'	tª ambiente	Lavar en TFS
10'	tª ambiente	Lavar en TF
48-72 horas	4°C	Incubación con el segundo anticuerpo primario diluido en solución de incubación preparada en TF
3x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2 horas	tª ambiente	Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 en TF
3x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2 horas	tª ambiente	Incubación con el complejo ABC diluido 1:200 en TF
3x15'	tª ambiente	Lavar en TF
20'	tª ambiente	Revelado con DAB al 0.05% y H ₂ O ₂ al 0.003% en TF
4x15'	tª ambiente	Lavar en TF
1 hora	tª ambiente	Postfijación e intensificación con 1% OsO ₄ en TF en oscuridad
4x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2x3'	4°C	Etanol 30°
2x10'	4°C	Etanol 50°
2x10'	4°C	Etanol 70°
45'	4°C	Contrastado con 2% Acetato de Uranilo en Etanol 70° en oscuridad
2x3'	4°C	Etanol 70°
2x10'	4°C	Etanol 96°
2x10'	4°C	Etanol 100°
2x10'	tª ambiente	Etanol 100° con sulfato cúprico
2x8'	tª ambiente	Óxido de propileno
24 horas	tª ambiente	Infiltrar en resina Durcupan
24 horas	60°C	Incluir en plano y polimerizar la resina

Marcaje inmunohistoquímico doble con DAB y DAB-Ni (apartado 4.8.2.4.)

45'	tª ambiente	Solución de bloqueo preparada en TF
24 horas	tª ambiente	Incubación con el primer anticuerpo primario diluido en solución de incubación preparada en TF
3x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2 horas	tª ambiente	Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 en TF
3x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2 horas	tª ambiente	Incubación con el complejo ABC diluido 1:200 en TF
3x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2'-20'	tª ambiente	Revelado con DAB-Ni al 0.03% y H ₂ O ₂ al 0.003% en TF
4x15'	tª ambiente	Lavar en TF
20'	tª ambiente	Incubación con azida sódica al 0,05% en TF
4x15'	tª ambiente	Lavar en TF
24 horas	tª ambiente	Incubación con el segundo anticuerpo primario diluido en solución de incubación preparada con TF
3x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2 horas	tª ambiente	Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 en TF
3x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2 horas	tª ambiente	Incubación con el complejo ABC diluido 1:200 en TF
3x15'	tª ambiente	Lavar en TF
5'-20'	tª ambiente	Revelado con DAB al 0.05% y H ₂ O ₂ al 0.003% en TF
4x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2x3'	tª ambiente	Etanol 30º
2x10'	tª ambiente	Etanol 50º
2x15'	tª ambiente	Etanol 70º
2x15'	tª ambiente	Etanol 96º
2x15'	tª ambiente	Etanol 100º
2x8'	tª ambiente	Óxido de propileno
24 horas	tª ambiente	Infiltrar en resina Durcupan
24 horas	60ºC	Incluir en plano y polimerizar la resina

Marcaje inmunohistoquímico doble de fluorescencia si los anticuerpos primarios tienen distinto origen (apartado 4.8.2.5.)

3x5'	tª ambiente	Lavar en TF
20'	tª ambiente	Borohidruro sódico al 1% en TF (preparar 30' antes de ser usado) si el tejido ha estado fijado con las soluciones de perfusión 2 o 3
4x5'	tª ambiente	Lavar en TF
5'	tª ambiente	Lavar en TFS
45'	tª ambiente	Solución de bloqueo preparada con TFS
24 horas	tª ambiente	Incubación con una mezcla de los anticuerpos primarios diluidos en solución de incubación preparada con TFS
3x15'	tª ambiente	Lavar en TFS
2 horas	tª ambiente	Incubación con los anticuerpos secundarios fluorescentes
3x15'	tª ambiente	Lavar en TFS
		Montar sobre portaobjetos gelatinizados con N-propil-galeato

Marcaje inmunohistoquímico doble de fluorescencia si los anticuerpos primarios tienen el mismo origen; empleo de los fragmentos F(ab) (apartado 4.8.2.6.)

3x5'	t ^a ambiente	Lavar en TF
20'	t ^a ambiente	Borohidruro sódico al 1% en TF (preparar 30' antes de ser usado) si el tejido ha estado fijado con las soluciones de perfusión 2 o 3
4x5'	t ^a ambiente	Lavar en TF
5'	t ^a ambiente	Lavar en TFS
45'	t ^a ambiente	Solución de bloqueo preparada en TFS
24 horas	t ^a ambiente	Incubación con el primer anticuerpo primario diluido en solución de incubación preparada en TFS
3x15'	t ^a ambiente	Lavar en TFS
60'	t ^a ambiente	Incubación con los fragmentos F(ab) diluidos 1:100 en TFS
3x15'	t ^a ambiente	Lavar en TFS
2 horas	t ^a ambiente	Incubación con el anticuerpo secundario fluorescente diluido en TFS
3x15'	t ^a ambiente	Lavar en TFS
45'	t ^a ambiente	Solución de bloqueo preparada en TFS
3x15'	t ^a ambiente	Lavar en TFS
24 horas	t ^a ambiente	Incubación con el segundo anticuerpo primario diluido en TFS
3x15'	t ^a ambiente	Lavar en TFS
2 horas	t ^a ambiente	Incubación con el anticuerpo secundario fluorescente diluido en TFS
3x15'	t ^a ambiente	Lavar en TFS
		Montar sobre portaobjetos gelatinizados con N-propil-galeato

Marcajes inmunocitoquímicos dobles donde se utiliza oro coloidal en postinclusión

Marcaje inmunocitoquímico doble con ABC en preinclusión y oro coloidal en postinclusión (apartado 4.8.2.2.)

En primer lugar se realiza la detección en preinclusión del anticuerpo utilizando el método ABC, tal y como se detalla en el apartado 4.8.1.1.1.2. Después de su análisis se procede a la reinclusión de una sección de tejido y a la obtención de secciones ultrafinas donde se realizará la siguiente detección inmunocitoquímica.

10'	1ª ambiente	1% ácido peryódico en agua	Filtrar
3x3'	1ª ambiente	Lavar con agua	Filtrar
	1ª ambiente	Secar las rejillas con papel de filtro	
15'	1ª ambiente	2% metaperyodato sódico en agua	Filtrar
3x3'	1ª ambiente	Lavar con agua	Filtrar
	1ª ambiente	Secar las rejillas con papel de filtro	
3'	1ª ambiente	TTS	Filtrar
30'	1ª ambiente	Bloqueo: 1% Ovoalbúmina en TTS	Filtrar
2x10'	1ª ambiente	TTS	Filtrar
2h	1ª ambiente	Anticuerpo primario diluido en TTS con 1% NGS	
2x10'	1ª ambiente	TTS	Filtrar
10'	1ª ambiente	0.5% de Tween-20 en TT	Filtrar
2h	1ª ambiente	Anticuerpo secundario diluido 1:15 en 0.5% de Tween-20 en TT	
4x7'	1ª ambiente	TFS	Filtrar
2'	1ª ambiente	2% Glutaraldehído en TFS	Filtrar
4x2'	1ª ambiente	Lavar en agua	Filtrar
1'30"	1ª ambiente	Amplificación del oro	
4x2'	1ª ambiente	Lavar en agua	Filtrar
45'	1ª ambiente	Acetato de uranilo a saturación en agua	Filtrar
3x2'	1ª ambiente	Lavar en agua	Filtrar
12'	1ª ambiente	Citrato de plomo (Solución de Reynolds)	
10x2'	1ª ambiente	Lavar en agua	Filtrar

Marcaje inmunocitoquímico doble con partículas de oro coloidal de un tamaño determinado en preinclusión y con partículas de oro coloidal de un tamaño diferente en postinclusión (apartado 4.8.2.3.)

En primer lugar se realiza la detección en preinclusión del anticuerpo utilizando el método ABC, tal y como se detalla en el apartado 4.8.1.1.2. Después de su análisis se procede a la reinclusión de una sección de tejido y a la obtención de secciones ultrafinas donde se realizará la siguiente detección inmunocitoquímica.

10'	tª ambiente	1% ácido peryódico en agua	Filtrar
3x3'	tª ambiente	Lavar con agua	Filtrar
	tª ambiente	Secar las rejillas con papel de filtro	
15'	tª ambiente	2% metaperyodato sódico en agua	Filtrar
3x3'	tª ambiente	Lavar con agua	Filtrar
	tª ambiente	Secar las rejillas con papel de filtro	
3'	tª ambiente	TTS	Filtrar
30'	tª ambiente	Bloqueo: 1% Ovoalbúmina en TTS	Filtrar
2x10'	tª ambiente	TTS	Filtrar
2h	tª ambiente	Anticuerpo primario diluido en TTS con 1% NGS	
2x10'	tª ambiente	TTS	Filtrar
10'	tª ambiente	0.5% de Tween-20 en TT	Filtrar
2h	tª ambiente	Anticuerpo secundario diluido 1:15 en 0.5% de Tween-20 en TT	
4x7'	tª ambiente	TFS	Filtrar
2'	tª ambiente	2% Glutaraldehído en TFS	Filtrar
4x2'	tª ambiente	Lavar en agua	Filtrar
45'	tª ambiente	Acetato de uranilo a saturación en agua	Filtrar
3x2'	tª ambiente	Lavar en agua	Filtrar
12'	tª ambiente	Citrato de plomo (Solución de Reynolds)	
10x2'	tª ambiente	Lavar en agua	Filtrar

Detección inmunocitoquímica en secciones semifinas adyacentes de tejido obtenido por crioultramicrotomía (apartado 4.10.2.)

10'	tª ambiente	Lavar en TFS
30'	tª ambiente	Bloquear el tejido con 0.2M glicina en TFS
3x10'	tª ambiente	Lavar con 2% de BSA en TFS
60'	tª ambiente	Incubación con el anticuerpo primario diluido en TFS-BSA
3x15'	tª ambiente	Lavar en TFS
45'	tª ambiente	Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado diluido 1:200 en TFS
3x15'	tª ambiente	Lavar en TFS
45'	tª ambiente	Incubación con el complejo ABC diluido 1:200 en TFS
3x15'	tª ambiente	Lavar en TF
5'	tª ambiente	Revelado con DAB al 0.05% y H ₂ O ₂ al 0.003% en TF
4x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2'	tª ambiente	Postfijación e intensificación con 1% de OsO ₄ en TF
4x15'	tª ambiente	Lavar en TF
2'	tª ambiente	Etanol 50°
2'	tª ambiente	Etanol 70°
2'	tª ambiente	Etanol 96°
2'	tª ambiente	Etanol 100°
2'	tª ambiente	Xilol
		Montar con Eukitt

Anexo II.
PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Characterization of Somatostatin- and Cholecystinin-Immunoreactive Periglomerular Cells in the Rat Olfactory Bulb

MARÍA GUTIÉRREZ-MECINAS, CARLOS CRESPO,*
 JOSÉ MIGUEL BLASCO-IBÁÑEZ, FRANCISCO JAVIER GRACIA-LLANES,
 ANA ISABEL MARQUÉS-MARÍ, AND FRANCISCO JOSÉ MARTÍNEZ-GUIJARRO
 Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de
 Valencia, E-46100 Burjassot, Spain

ABSTRACT

Periglomerular cells (PG) are interneurons of the olfactory bulb (OB) that modulate the first synaptic relay of the olfactory information from the olfactory nerve to the dendrites of the bulbar principal cells. Previous investigations have pointed to the heterogeneity of these interneurons and have demonstrated the presence of two different types of PG. In the rat OB, type 1 PG receive synaptic contacts from the olfactory axons and are γ -aminobutyric acid (GABA)-ergic, whereas type 2 PG do not receive synaptic contacts from the olfactory axons and are GABA immunonegative. In this study, we analyze and characterize neurochemically a group of PG that has not been previously classified either as type 1 or type 2. These PG are immunoreactive for the neuropeptides somatostatin (SOM) or cholecystinin (CCK). By using double immunocytochemistry, we demonstrate that neither the SOM- nor the CCK-immunoreactive PG contain GABA immunoreactivity, which is a neurochemical feature of type 1 PG. Moreover, they do not contain the calcium-binding proteins calbindin D-28k and calretinin, which are neurochemical markers of the type 2 PG. Electron microscopy demonstrates that the dendrites of the SOM- and CCK-containing PG are distributed in the synaptic and sensory subcompartments of the glomerular neuropil and receive synaptic contacts from the olfactory axons. Therefore, they should be included in the type 1 group rather than in the type 2. Altogether, these data indicate that the SOM- and the CCK-containing PG may constitute a group of GABA-immunonegative type 1 PG that has not been previously described. These results further extend the high degree of complexity of the glomerular circuitry. *J. Comp. Neurol.* 489:467–479, 2005. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Indexing terms: interneurons; GABA; olfaction; olfactory glomeruli; neuroactive peptides

The olfactory receptors in the nasal cavity transduce the olfactory information received in their cilia into action potentials that travel through their axons toward the olfactory bulb (OB). This paleocortical structure is the first brain station in the processing of the olfactory information. The synaptic relay of the sensory information from the axons of the olfactory sensory cells to the dendrites of the bulbar principal cells, mitral and tufted cells (for review see Shepherd and Greer, 1998), takes place in the OB. This relay is accomplished in peculiar spherical structures of neuropil named *olfactory glomeruli*, which have recently become a point of interest in numerous investigations (Vassar et al., 1994; Chao et al., 1997; Bailey et al., 1999; Kasowski et al., 1999; Treloar et al., 2002; Aungst et al., 2003; Murphy et al., 2004).

The olfactory glomeruli are arranged into a layer, the glomerular layer (GL), in the most superficial part of the OB. The specific activation of some olfactory receptors leads to a specific pattern of activation of different olfac-

Grant sponsor: Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología –Fondo Europeo de Desarrollo Regional; Grant number: BFI2001-3186; Grant number: BPU2004-00931/BFI; Grant sponsor: Generalitat Valenciana; Grant number: GV04A-076; Grant number: 03/119.

*Correspondence to: Carlos Crespo, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Biológicas, Street Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot, Spain. E-mail: carlos.crespo@uv.es

Received 15 June 2004; Revised 6 October 2004; Accepted 18 April 2005
 DOI 10.1002/cns.20649

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

tory glomeruli with a topographically specific location in the GL, constituting something like an "odor map" in the OB (Belluscio et al., 2002; Treloar et al., 2002; Xu et al., 2003). A population of bulbar interneurons, which surround each olfactory glomerulus and are called *periglomerular cells* (PG; Pinching and Powell, 1971), modulates the glomerular processing, acting as "gatekeepers" of the olfactory system, and is a key element in odor decoding. Despite the functional importance of PG, details on their specific roles in the glomerular circuits remain poorly understood.

Previous neuroanatomical investigations demonstrate that at least two different types of PG with different connectivity and neurochemical features can be clearly distinguished in the glomerular neuropil of the rat OB (Kosaka et al., 1997, 1998; Toida et al., 1998, 2000). 1) Type 1 PG innervate the sensory and the synaptic subcompartments previously described by Chao et al. (1997) and Kasowski et al. (1999) in the glomerular neuropil, receive synaptic contacts from the olfactory axons, and are γ -aminobutyric acid (GABA)-ergic. This type includes two different subsets of cells; the first group is dopaminergic and tyrosine hydroxylase (TH) immunopositive (Toida et al., 2000), and the second group is presumably nitrergic and reactive for the histochemical technique of NADPH-diaphorase (Crespo et al., 2003). 2) Type 2 PG restrict their dendrites to the synaptic subcompartment of the glomerulus and therefore do not receive synaptic contacts from the olfactory nerve axons, contrary to the classical view of the bulbar circuitry organization (Shepherd and Greer, 1998). Moreover, at least in the rat, they are GABA and glutamic acid decarboxylase (GAD) immunonegative. This type also includes two different groups of PG; the first group expresses the calcium binding protein calretinin (CR; Kosaka et al., 1997, 1998), and the second expresses the calcium binding protein calbindin D-28k (CB; Kosaka et al., 1997, 1998, 2001; Toida et al., 1998). Electrophysiological data confirm these neuroanatomical observations and indicate that PG are not a homogeneous cell population, showing at least two different types of electrophysiological responses in these interneurons (Puopolo and Belluzzi, 1998).

Although type 1 and type 2 PG can be well characterized with CB, CR, GABA, and TH immunohistochemistry, there are neuroanatomical markers that label other populations of PG that have not been characterized yet as type 1 or 2. Previous reports describing the distribution of neuropeptides in the OB reported the presence of PG immunoreactive for somatostatin (SOM) and cholecystokinin (CCK; Seroogy et al., 1985; Takami et al., 1990). It is presently unknown whether these PG belong to type 1 or 2, or, on the contrary, whether they constitute additional types that also take part in the glomerular circuitry. In this study, we investigate the neurochemical features and connectivity of the SOM- and CCK-containing PG under light and electron microscopy. Our results support the presence of a group of peptidergic PG that receives synapses from the olfactory axons and therefore may be classified as type 1. However, these peptidergic cells, like those in type 2, are GABA immunonegative in the rat OB. These data provide insight into the glomerular circuitry, giving a neuroanatomical basis for future investigations of olfactory function.

MATERIALS AND METHODS

Animals and tissue preparations

Sixteen adult female Wistar rats were deeply anesthetized with 4% chloral hydrate in physiological saline (1 ml/100 g body weight) and intraaortically perfused with saline for 1 minute, followed by 500 ml of fixative according to the experimental procedures explained below. Ten of the sixteen animals were perfused with 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M, pH 7.4, phosphate buffer (PB) and used for analysis of the distribution of SOM and CCK, quantification of the immunopositive cells, experiments of double immunostaining with SOM and CB/CR/CCK, and experiments of double immunostaining with CCK and CB/CR/TH. The six remaining animals were perfused with 4% (w/v) paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in PB and used for colocalization analysis of SOM or CCK with GABA and for electron microscopy. All the procedures were in accordance with the guidelines of the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and conformed to NIH guidelines for the use and care of animals.

After perfusion, the brains were removed, and the OBs were dissected out and carefully rinsed overnight in cold PB (4°C). Then, 60- μ m-thick transverse sections were cut on a vibratome (VT 1000E; Leica, Nussloch, Germany) and collected in cold PB (4°C) for further processing.

Preembedding immunocytochemical detection of SOM and CCK for light and electron microscopy

Free-floating sections were cryoprotected overnight by immersion in 25% sucrose and 10% glycerol in 0.05 M PB and then freeze-thawed three times in liquid nitrogen to enhance antibody penetration. After extensive washes in PB, sections from animals perfused with the fixative containing glutaraldehyde were treated with 1% NaBH₄ in PB for 30 minutes and extensively rinsed in PB. The avidin-biotin-immunoperoxidase method (Hsu et al., 1981) was used for immunostaining. Sections were sequentially incubated in 1) blocking solution, containing 10% normal goat serum (NGS; Vector, Burlingame, CA) and 2% bovine serum albumin (BSA; Sigma, St. Louis, MO; A9647) in PB for 45 minutes at room temperature; 2) polyclonal rabbit anti-SOM serum (Lantos et al., 1995; 1:10,000 in PB containing 1% NGS) or monoclonal mouse anti-CCK antibody (provided by CURE/Digestive Diseases Research Center, Antibody/RIA Core, University of California, Los Angeles; 1:5,000 in PB containing 1% NGS) for 48 hours at 4°C; 3) biotinylated goat anti-rabbit or goat anti-mouse IgG (Vector; 1:200 in PB) for 2 hours at room temperature; 4) avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vector; 1:200 in PB) for 2 hours at room temperature. After each step, sections were carefully rinsed in PB (3 \times 10 minutes). Finally, the peroxidase reaction was developed by using 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma; D5637) as chromogen and 0.003% hydrogen peroxide in PB for 10–20 minutes at room temperature, until SOM- and CCK-immunostaining could be clearly visualized under the microscope. Sections were then carefully rinsed in PB (3 \times 10 minutes), treated with 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA; 19150) for 1 hour at room temperature, and washed in PB. Finally, they were stained with 1% uranyl acetate for 90 minutes, dehydrated through graded ethanol series, cleared in pro-

pylene oxide and flat-embedded in Durcupan (ACM; Fluka AG) between slides and coverslips. Durcupan was polymerized overnight at 60°C. Flat-embedded sections were examined at the light microscope and, after analysis, selected sections containing SOM- and CCK-positive PG from the animals perfused with glutaraldehyde were re-embedded in Durcupan. The resulting blocks were cut on an ultramicrotome, and serial ultrathin sections were mounted on Formvar-coated single-slot nickel grids. Some sections were further processed for the postembedding immunogold detection of GABA as described below. Finally, the ultrathin sections were stained with lead citrate and analyzed under the electron microscope.

The company or laboratory of origin tested the specificity of each antiserum used in this study. Additional controls were carried out by omitting the primary or secondary antibody in each step and by incubating some sections exclusively in 0.05% DAB and 0.003% hydrogen peroxide in PB, to exclude the presence of endogenous peroxidase in the tissue. No staining was found in those controls.

Double immunocytochemistry for SOM and CB/CR/GABA/CCK

To characterize neurochemically the SOM-immunopositive PG, we used double immunofluorescence for codetection of SOM and CB, CR (neuroanatomical markers for the type 2 PG), or GABA (the neuroanatomical marker for the type 1 PG). Moreover, to investigate a putative colocalization of SOM- and CCK in the same PG, we used double immunofluorescence for SOM and CCK.

In these experiments, 60- μ m vibratome sections were incubated in blocking solution containing 10% normal donkey serum (NDS), 2% BSA, and 0.1% Triton X-100 in 0.01 M, pH 7.4, phosphate-buffered saline (PBS) for 45 minutes at room temperature. Then, they were incubated 48 hours at 4°C in the mixture of primary antibodies. The dilution of the primary antibodies in the final mixture was as follows: 1:5,000 for the rabbit anti-SOM serum, 1:2,500 for the mouse anti-CB antibody (SWant, Bellinzona, Switzerland), 1:2,000 for the mouse anti-CR antibody (SWant), 1:5,000 for the mouse anti-GABA antibody (SWant), and 1:2,000 for the mouse anti-CCK antibody. Primary antibodies were diluted in PBS containing 1% NDS, 2% BSA, and 0.1% Triton X-100. Afterward, the sections were incubated for 2 hours at room temperature in a mixture of donkey anti-mouse Cy2-conjugated IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA; 1:400 in the final mixture) and donkey anti-rabbit Cy3-conjugated IgG (Jackson ImmunoResearch; 1:400 in the final mixture). Secondary antibodies were diluted in PBS containing 0.1% Triton X-100. Finally, after being washed in PBS and PB, the sections were mounted on gelatin-coated slides and cover-slipped with an antifading medium (0.42 g glycine, 0.021 g sodium hydroxide, 0.51 g sodium chloride, 0.03 g sodium azide, and 5 g *N*-propyl gallate in 100 ml of 70% glycerin). Double-labeled neurons were identified under a photomicroscope equipped with epifluorescence and appropriate filters.

Controls for the immunohistochemical procedure were prepared by incubating sections without the primary or secondary antibodies in each step. No fluorescence was found in these controls. In addition, omission of one of the primary or secondary antibodies resulted in the disappearance of staining for that particular antigen, without changing the pattern of immunoreactivity for the other.

Colocalization of CCK with CB/CR/TH/GABA

By using the same protocol described above for SOM, we characterized neurochemically the CCK-containing PG via double immunofluorescence for the detection of CCK combined with CB, CR, GABA, and TH. The dilution of primary antibodies in the mixture was as follows: 1:2,000 for the mouse anti-CCK antibody, 1:4,000 for the rabbit anti-CB serum (SWant), 1:2,000 for the rabbit anti-CR serum (SWant), 1:2,000 for the rabbit anti-GABA serum (Sigma; A2052), or 1:10,000 for the rabbit anti-TH serum (Affinity Research Products, Exeter, United Kingdom). Controls for the immunohistochemical procedure were prepared as described above.

Postembedding immunogold staining for GABA

Preembedding immunodetection for SOM and CCK was combined with postembedding immunogold detection for GABA, which was analyzed at the electron microscope. Postembedding immunostaining for GABA was carried out according to Somogyi and Hodgson (1985), with slight variations as previously reported (Crespo et al., 2000). All steps were carried out on droplets of solution in humid Petri dishes as follows: 1% periodic acid (H_2IO_6) for 10 minutes; washing in distilled water (3×3 minutes); 2% sodium metaperiodate ($NaIO_4$) for 10 minutes; washing in distilled water (3×3 minutes); washing in 0.05 M, pH 7.4, Tris-HCl-buffered saline (TBS) for 3 minutes; blocking solution containing 1% chicken egg albumin in TBS for 30 minutes; washing in TBS (2×10 minutes); rabbit anti-GABA serum (Sigma; 1:2,500 in 1% NGS in TBS) for 2 hours; washing in TBS (2×10 minutes); 1% BSA and 0.05% Tween 20 in 0.05 M, pH 7.4, Tris-HCl buffer (TB) for 10 minutes; goat anti-rabbit IgG-coated colloidal gold (Sigma; G7402, 10 nm, 1:15 in TB containing 1% BSA and 0.05% Tween 20) for 2 hours; washing in distilled water (3×5 minutes) and PBS (4×5 minutes); 2% glutaraldehyde in PBS for 2 minutes; washing in distilled water (4×5 minutes); silver enhancement of the gold particles for 1 minute; washing in distilled water (4×5 minutes); staining with saturated uranyl acetate for 30 minutes; washing in distilled water (4×5 minutes); staining with lead citrate; washing in distilled water; and then drying.

Profiles showing a density of colloidal gold particles tenfold higher than background in two or three adjacent sections were considered GABA immunoreactive. Profiles of olfactory nerve terminals and mitral/tufted cells (presumed to be glutamatergic elements) were used to establish background density. Omission or substitution of the anti-GABA serum with normal rabbit serum resulted in a loss of specific staining; i.e., no signs of colloidal gold accumulation could be detected.

Data analysis

The number of SOM- and CCK-containing PG was estimated per olfactory glomerulus. For that, the OBs of six animals were cut on the vibratome, and 60- μ m-thick transverse sections were serially collected. The series from three animals were processed for SOM immunostaining. The series from the three remaining animals were CCK immunostained. From each animal, sections were selected in one-in-five series at equidistant levels throughout the rostrocaudal axis as follows. The first chosen sec-

tion was that showing all OB layers. The remaining sections were selected at 300- μm intervals. From each of these sections, five olfactory glomeruli were randomly selected and analyzed. Whole olfactory glomeruli were reconstructed from adjacent sections of the series and the total number of SOM- or CCK-immunopositive PG innervating them was counted in these glomeruli with a $\times 40$ objective. Finally, the mean and SD of the number of SOM- and CCK-immunopositive PG per olfactory glomerulus were calculated.

To validate the quantification, we checked the penetration of the antibody throughout the 60 μm of the section thickness. For this purpose, some SOM- and CCK-immunostained sections, which were flat embedded in Durcupan, were cut into semithin (1 μm) sections with an ultramicrotome, and the semithin sections were serially collected. After that, each semithin section from a vibratome section was carefully analyzed, checking the density of CCK- and SOM-immunopositive elements. The density of immunostaining (for both markers) was similar in all the semithin sections, demonstrating complete penetration of both the anti-SOM and the anti-CCK antibodies.

For cell counting, we have differentiated CCK-positive PG from CCK-positive external tufted cells on the basis of their soma size and immunostaining features together with morphological aspects. Although it is well known that the soma size of PG and external tufted cells can overlap, this overlapping affects an extremely low proportion of these cells. The fact remains that the vast majority of the PG and external tufted cells have different soma sizes. Moreover, the DAB precipitate in the tufted cells does not allow visualization of the nuclear region. On the contrary, the nucleus is perfectly distinguishable in the PG.

Image production

The material was analyzed by using a Nikon photomicroscope equipped with an epifluorescence set for optical microscopy or by using a Jeol transmission electron microscope for electron microscopy. Images from light microscopy were captured with an Olympus digital camera system, transferred to a PC, and adjusted with Micrografix Picture Publisher 6.0 software (Micrografix Inc.). Only size, contrast, and brightness were slightly modified. Finally, resulting image files were assembled into montages by using the same software, and lettering was added. Electron microscope photographic negatives were scanned at high resolution, inverted, and adjusted as described above. The scheme shown in Figure 6 was designed in Micrografix Picture Publisher 6.0.

RESULTS

SOM and CCK immunoreactivity in the rat OB

The distribution of SOM in the rat OB displayed a laminar pattern throughout the bulbar layers. The olfactory nerve layer, the external plexiform layer, and the mitral cell layer did not show any SOM immunoreactivity (Fig. 1A). SOM-containing elements were restricted to a few somata in the periglomerular region of the GL, deep portions of the granule cell layer, and white matter. In addition to this, SOM-containing fibers ran in all directions throughout the granule cell layer.

The cells found in the inframitral layers corresponded to deep short-axon cells with oval or polygonal somata and bipolar or multipolar morphology. Those found in the periglomerular region of the olfactory glomeruli had the morphology and size (5–9 μm) of PG (Fig. 1A). They had a round or oval soma from which arose a solitary dendrite that innervated the olfactory glomerulus, ramifying profusely into the glomerular neuropil (Fig. 1B). The dendritic branches had a high density of gemmules in their distal portions (Fig. 1C). Quantitative analyses revealed a frequency of 25.5 SOM-containing PG per olfactory glomerulus (SD 7.1).

The distribution of CCK immunoreactivity in the rat OB also displayed a laminar pattern. The CCK-immunopositive elements were found in all the bulbar layers, with the exception of the olfactory nerve layer (Fig. 2A). The CCK-immunopositive elements included external, middle, and internal tufted cells located in the external plexiform layer (Fig. 2A) and deep short axon cells placed in the inframitral region, mainly in the deep portions of the granule cell layer and white matter. Moreover, in the inframitral region, some CCK-containing axons were present, mainly in the internal plexiform layer but also disseminated into the granule cell layer. Finally, a population of PG showed CCK immunoreactivity in the GL. Quantification demonstrated a frequency of 40 CCK-containing PG per olfactory glomerulus (SD 4.4). Similarly to the SOM-containing PG, the dendrites of the CCK-containing ones ramified profusely into the glomerular neuropil and showed a high density of gemmules in their distal portions (Fig. 2B). In addition to the dendrites of the PG, the glomerular neuropil also contained the primary dendrites of CCK-containing tufted cells (Fig. 2C). Nevertheless, the dendrites of the PG and the dendritic trunks of the tufted cells were easily distinguishable on the basis of their morphology under light and electron microscopy. In our study, we have focused our interest on the SOM- or CCK-containing PG and their connectivity, disregarding other elements containing these peptides.

Colocalization of SOM with GABA/CB/CR

To characterize neurochemically the SOM-containing PG, we analyzed the colocalization of SOM and different markers for type 1 PG (GABA) and type 2 PG (CB and CR). In the double-immunostained sections, 50 SOM-immunopositive PG were randomly selected, and then the presence of GABA, CB, and CR was analyzed in these cells. SOM/GABA double immunostaining clearly demonstrated that the SOM-containing PG were not GABA-immunoreactive ($n = 50$; Fig. 3A). The experiments with colocalization of SOM and CB or CR in the same cells demonstrated that the SOM-containing PG did not contain these calcium binding proteins ($n = 50$; Fig. 3B,C).

Colocalization of CCK with GABA/TH/CB/CR

By using the same procedure applied to the SOM-immunopositive PG, we have characterized neurochemically the CCK-containing PG via double immunostaining of CCK with GABA, TH, CB, or CR. In these experiments, 50 randomly selected CCK-containing PG were analyzed for the presence of each of these markers. The analysis demonstrated that the CCK-containing PG were neither

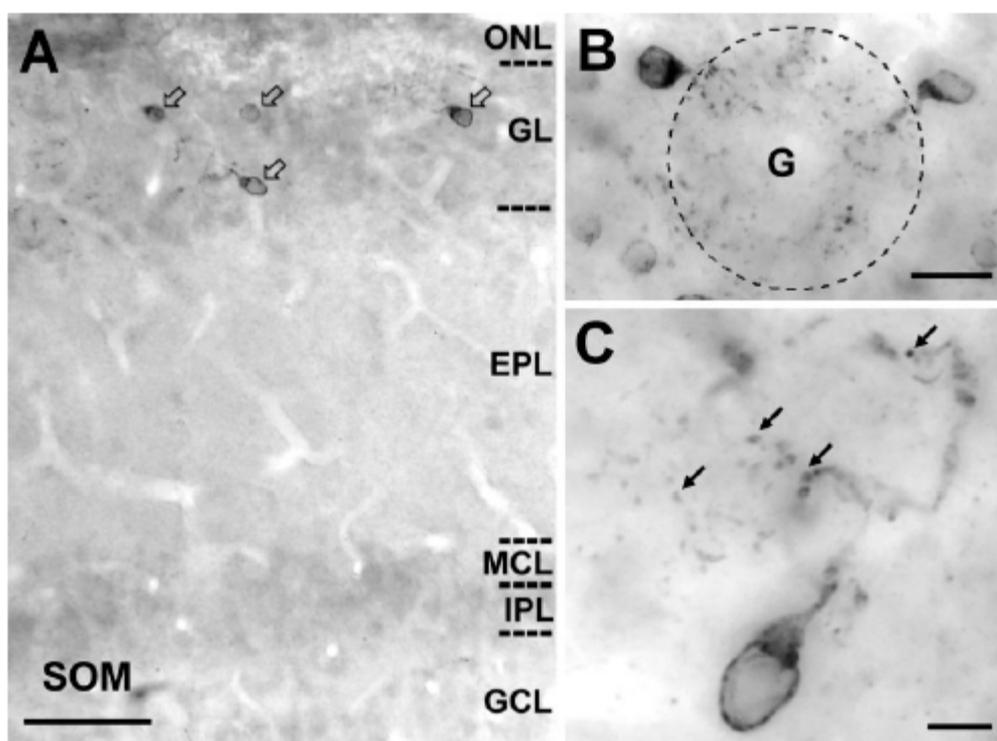


Fig. 1. A: Semiparaventricular view of the somatostatin (SOM) distribution in the superficial layers of the olfactory bulb. SOM-containing periglomerular cells (open arrows) are homogeneously distributed throughout the glomerular layer (GL). B: The dendrites of these cells innervate the glomerular neuropil (G). C: A high density of glomeruli

(solid arrows) can be found in the apical portions of the dendrites of the SOM-containing periglomerular cells. EPL, external plexiform layer; GCL, granule cell layer; IPL, internal plexiform layer; MCL, mitral cell layer; ONL, olfactory nerve layer. Scale bars = 50 μ m in A; 12.5 μ m in B; 5 μ m in C.

GABA immunopositive ($n = 50$; Fig. 3D) nor dopaminergic ($n = 50$; Fig. 3E). Moreover, they were neither CB ($n = 50$; Fig. 3F) nor CR ($n = 50$; Fig. 3G) immunopositive.

Colocalization of SOM with CCK

Because antibodies against SOM and CCK stained restricted groups of PG that shared some neurochemical features (they were GABA-, CB-, and CR-immunonegative), it was interesting to investigate whether the SOM- and the CCK-containing PG were two different populations of interneurons. In this experiment, 50 SOM-immunopositive PG were randomly selected from the SOM/CCK double-immunostained sections and then analyzed for the presence of CCK. Additionally, 50 randomly selected CCK-containing PG were analyzed for the presence of SOM. There was no colocalization of SOM and CCK in the same cells ($n = 50$; Fig. 3H,I), indicating that SOM- and CCK-containing PG constitute two nonoverlapping populations of interneurons.

Connectivity of the SOM- and CCK-immunopositive PG

We have demonstrated that the SOM- and the CCK-containing PG are GABA immunonegative and, therefore, do not contain the typical neurotransmitter of type 1 PG described at present. On the other hand, they do not contain any of the markers previously described for type 2 PG (CB and CR). Type 1 PG extend their dendrites throughout the sensory and the synaptic subcompartments of the glomerular neuropil, and, in the sensory subcompartment, they receive synaptic contacts from the olfactory nerve. On the contrary, type 2 PG are characterized by the restriction of their dendrites to the synaptic subcompartment of the glomerular neuropil. This fact implies that the type 2 PG do not receive synaptic contacts from the axons of the olfactory nerve (Kosaka et al., 1997; Toida et al., 1998). Therefore, we have analyzed under the electron microscope the synaptic relationships of the

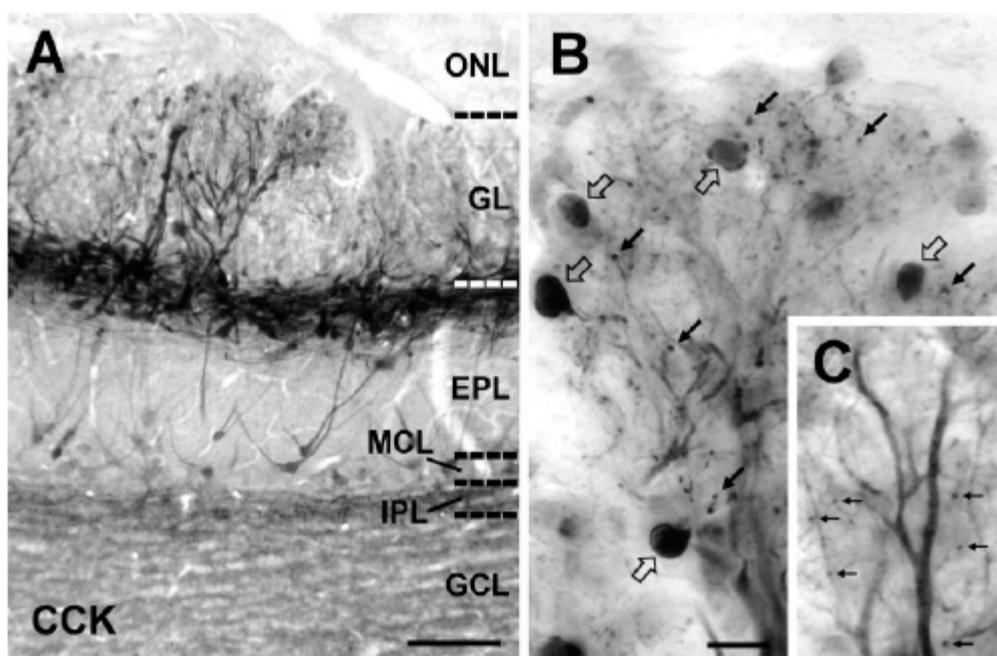


Fig. 2. A: Semipapanic view of the cholecystikinin (CCK) distribution in the olfactory bulb. Note the abundant immunostaining found in the glomerular layer (GL) and in the external plexiform layer (EPL). Most of the CCK-immunopositive elements correspond to internal, medium, and external tufted cells. B: In the GL, a population of CCK-containing periglomerular cells (open arrows) innervates the olfactory glomeruli. Their dendrites ramify profusely in the glomeru-

lar neuropil and show a high density of gemmules (solid arrows) in the apical portions. C: In the glomerular neuropil, the thick dendritic trunks of the tufted cells are perfectly distinguishable from the thin dendritic branches of the periglomerular cells and their gemmules (arrows). GCL, granule cell layer; IPL, internal plexiform layer; MCL, mitral cell layer; ONL, olfactory nerve layer. Scale bars = 100 μ m in A; 12.5 μ m in B, C.

SOM- and CCK-containing PG, paying attention to their connectivity with the olfactory nerve, to confirm or disprove their ascription to type 1 or type 2.

The SOM-containing profiles found in the glomerular neuropil showed the ultrastructural features previously described for the dendrites of the PG: irregular disposition of microtubules, presence of gemmules and spines with polymorph synaptic vesicles, and presence of presynaptic sites making symmetrical synaptic contacts. These profiles were not restricted to the synaptic subcompartment of the olfactory glomeruli and also innervated the sensory subcompartment. In this subcompartment, they received asymmetrical synaptic contacts from terminals of the olfactory nerve (Fig. 4A,B). Therefore, they do not belong to the population of type 2 PG. On the other hand, the SOM-containing profiles received asymmetrical synaptic contacts from the dendrites of the mitral/tufted cells (Fig. 4C) and, in turn, made symmetrical synaptic contacts upon them (Fig. 4D). Finally, the SOM-containing elements were frequently innervated in the synaptic subcompartment by axon terminals of unidentified origin (Fig. 4E,F). The electron microscopic analysis was completed combining preembedding SOM immunostaining with

postembedding immunogold detection of GABA. SOM-containing profiles of PG were devoid of gold particles, confirming that they are GABA immunonegative (Fig. 4G,H), as already demonstrated by the SOM/GABA double immunofluorescence.

The dendrites of the CCK-containing PG were clearly distinguishable from the dendrites of the CCK-containing tufted cells on the basis of their size and ultrastructural features. To avoid confusion with the dendrites of the CCK-containing tufted cells, we have considered and analyzed as belonging to CCK-containing PG only those dendritic profiles that were making symmetrical synaptic contacts on the dendrites of the principal cells or receiving asymmetrical synaptic contacts from them (Fig. 5). By using these criteria, we found that the ultrastructure of the dendrites of the CCK-containing PG was similar to that described for the SOM-containing PG. Moreover, these dendrites were also found in both the synaptic and the sensory subcompartments of the glomerular neuropil. In the sensory subcompartment, the dendrites of the CCK-containing PG received asymmetrical synaptic contacts from the terminals of the olfactory axons (Fig. 5A,B,E,F), demonstrating that the CCK-containing PG do not belong

SOM- AND CCK-IMMUNOREACTIVE PERIGLOMERULAR CELLS

473

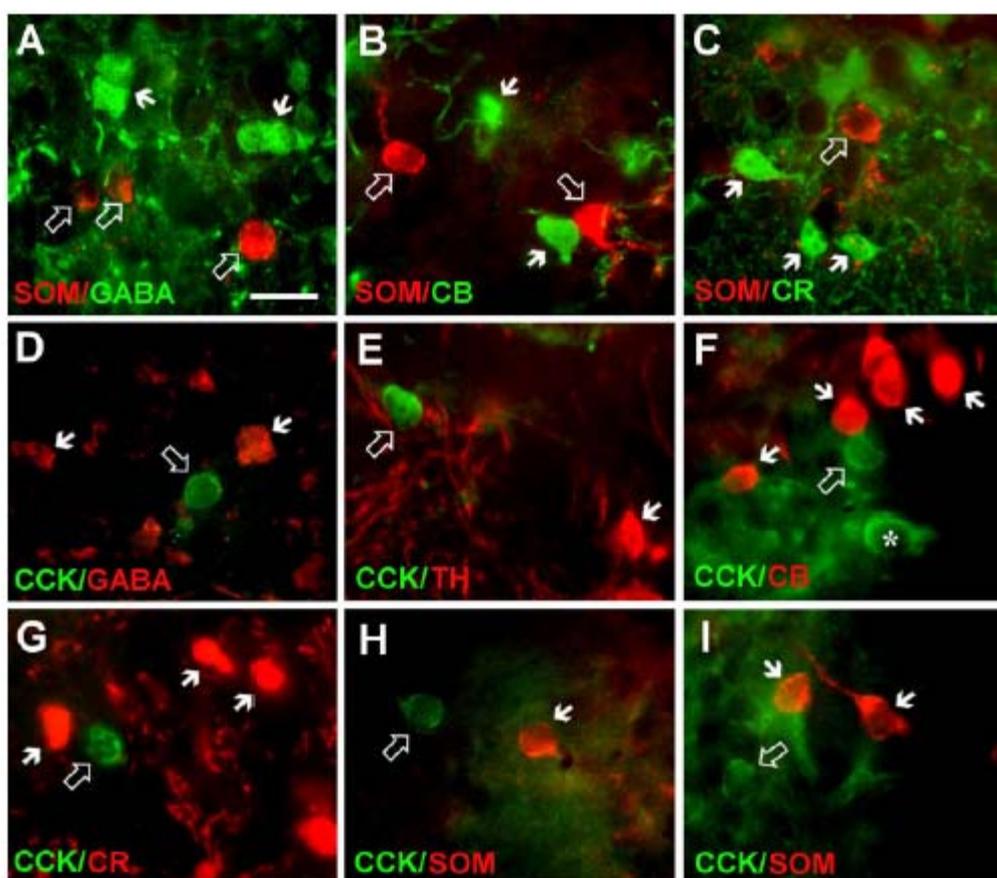


Fig. 3. Neurochemical characterization of the somatostatin (SOM)- and cholecystinin (CCK)-containing periglomerular cells by using double immunocytochemical techniques. A: SOM-containing periglomerular cells (open arrows) are GABA immunonegative. Solid arrows point to GABAergic periglomerular cells in the same region. B: SOM-containing periglomerular cells (open arrows) do not contain the calcium binding protein calbindin D-28k (CB). Solid arrows point to CB-immunopositive periglomerular cells. C: SOM-containing periglomerular cells (open arrow) are calcitonin (CR) immunonegative. Solid arrows point to CR-containing periglomerular cells. D: CCK-containing periglomerular cells (open arrow) are GABA immunonegative. Solid arrows point to GABA-immunopositive periglomerular

cells. E: CCK-immunopositive periglomerular cells (open arrow) are tyrosine hydroxylase (TH) immunonegative. Solid arrow points to TH-immunopositive periglomerular cells. F: CCK-immunostained periglomerular cells (open arrow) do not contain CB. Solid arrows point to CB-containing periglomerular cells, and the asterisk indicates a CCK-containing external tufted cell in the periglomerular region of the glomerular layer. G: CCK-immunostained periglomerular cells (open arrow) do not contain CR. Solid arrows point to CR-containing periglomerular cells. H,I: The SOM-containing periglomerular cells (solid arrows) and the CCK-containing cells (open arrows) constitute two separated populations of cells. Scale bar = 12.5 μ m in A (applies to A-I).

to the type 2. Moreover, in both the sensory and the synaptic subcompartments, the CCK-containing PG make symmetrical synaptic contacts upon mitral and tufted cells or receive asymmetrical synaptic contacts from them (Fig. 5A-D). Postembedding immunogold detection for GABA in ultrathin sections previously stained for CCK confirmed that CCK-containing PG are GABA immunonegative (Fig. 5E,F), as already demonstrated with the CCK/GABA double-immunofluorescence method.

DISCUSSION

In this report, we describe and characterize neurochemically a population of peptidergic PG in the rat OB. This population comprises, at least, two subpopulations of PG containing SOM and CCK, respectively. The signatures of these PG are that 1) they extend their dendritic branches throughout the sensory and the synaptic subcompartments of the glomerular neuropil, receive synap-

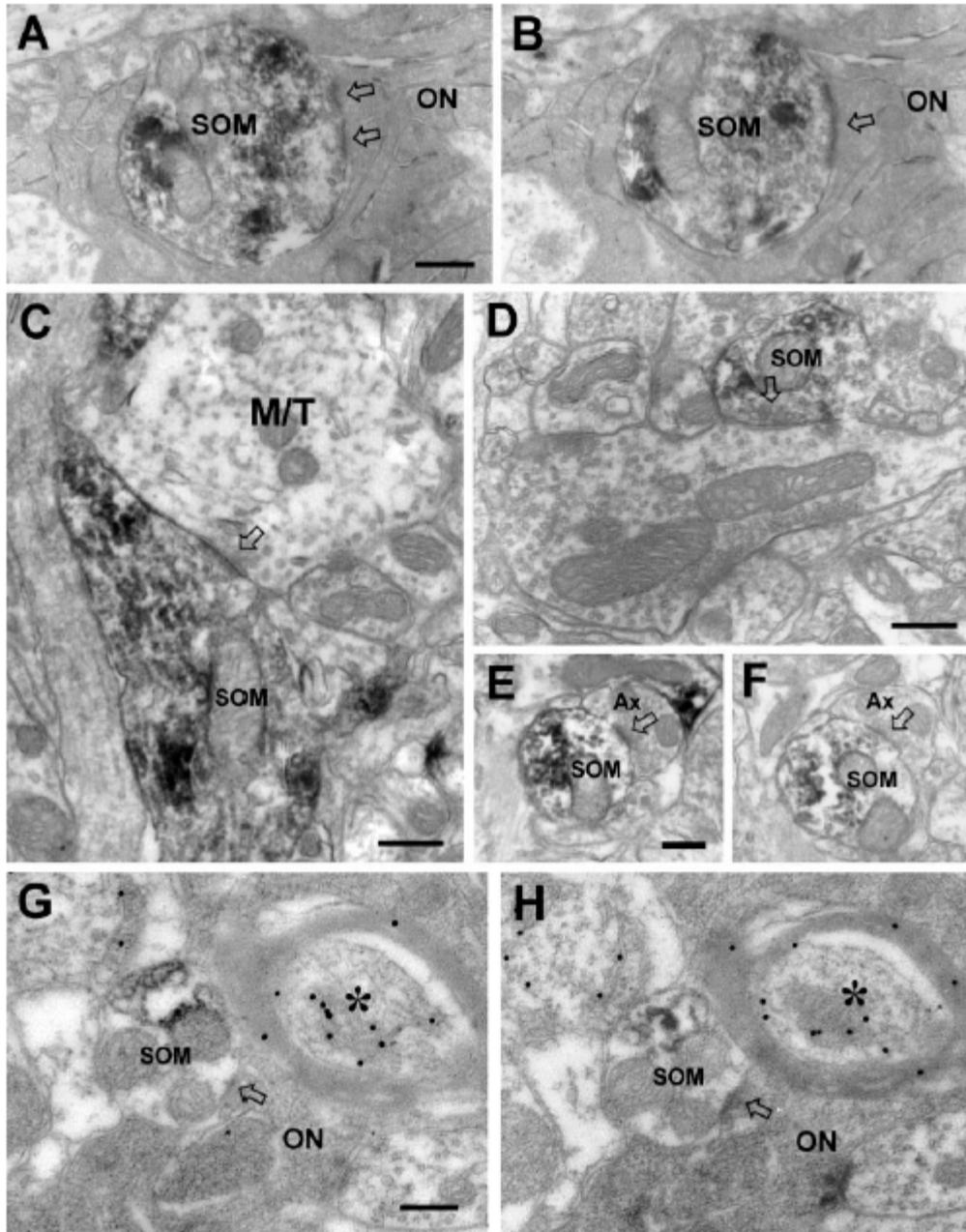


Figure 4

tic contacts from the axons of the olfactory nerve, and therefore are included in the type 1 PG, and 2) they are GABA immunonegative. These data provide insight into the bulbar neuroanatomy and demonstrate that the circuitry of the olfactory glomeruli is far more complex than previously considered (Fig. 6).

Ascription of the SOM- and CCK-immunoreactive PG to type 1 or type 2

The distribution of SOM and CCK has been previously analyzed in the rat OB (Seroogy et al., 1985, 1989; Takami et al., 1990; Liu and Shipley, 1994). Although the presence of SOM- and CCK-containing PG has been described in some of these reports (Seroogy et al., 1985; Takami et al., 1990), the neurochemistry and the connectivity of these interneurons have not been analyzed. Our results agree with these previous descriptions. Moreover, we analyze the ascription of the SOM- and CCK-containing PG to the different types of PG described to date in the rat OB. In this sense, Kosaka et al. (1995, 1997, 1998, 2001) and Toida et al. (1998, 2000) have studied in detail some subpopulations of PG in the rat OB. These authors conclude that PG are not homogeneous and describe two types of PG.

The first is a population of PG that receives synaptic contacts from the axons of the olfactory nerve. This population constitutes type 1, and it is composed of at least two subgroups of neurons; the first is dopaminergic and TH immunopositive (Toida et al., 2000), and the second is nitergic and reactive to NADPH-diaphorase histochemistry (Crespo et al., 2003). Most, if not all, of these PG are GABAergic. The second is a population of GABA- and GAD-immunonegative PG that does not receive synapses from the sensory axons. This population constitutes type 2, and it is composed of at least two subgroups of neurons expressing the calcium binding proteins CB and CR, respectively (Kosaka et al., 1997, 1998; Toida et al., 1998).

In a quantitative estimation of the PG of the rat, it has been assessed that the type 1 and 2 PG referred to above constitute about the 50% of the total number of PG that innervate an olfactory glomerulus (Kosaka et al., 1995, 1998). The remaining 50% has not been characterized, and nothing is known about their GABAergic nature or about the connectivity of these cells with the olfactory axons. Recently, Kosaka and Kosaka (2003) have described that the dendrites of the mitral and tufted cells establish gap junctions with the dendrites of putative PG that do not have the typical features of the previously described types 1 and 2. The authors discuss whether these PG could belong to a group of hitherto uncharacterized PG. Most of these PG may receive synapses from the olfactory axons, and about half of them may be GABA immunonegative and the remaining half just weakly GABA immunoposi-

tive but none strongly GABA immunopositive (Kosaka and Kosaka, 2003). We have demonstrated that the SOM- and the CCK-containing PG receive synaptic contacts from the olfactory axons (similar to the type 1 PG) but are GABA immunonegative (similar to the type 2 PG described for the rat olfactory bulb). We consider that this group of PG, on the basis of its connectivity with the olfactory axons, constitutes a group of type 1 PG different from the type 1 PG previously described in studies using GABA and TH (Kosaka et al., 1997, 1998; Toida et al., 2000) or NADPH-diaphorase (Crespo et al., 2003).

Probably, the SOM- and CCK-containing PG are a fraction of the PG population that establishes gap junctions with the dendrites of the mitral and tufted cells described by Kosaka and Kosaka (2003). Nevertheless, we could not prove this, because of the limitations of the technique. We could not use a concentration of glutaraldehyde higher than 0.5% in the perfusion of the animals, because both SOM and CCK immunoreactivities were lost when the concentration of glutaraldehyde was increased. With 0.5% glutaraldehyde, the ultrastructural preservation of the tissue was not good enough to recognize fine details, such as gap junctions, which were clearly visualized in the material of Kosaka and Kosaka (2003) using 1% and 2.5% glutaraldehyde.

Complexity of the glomerular circuitry in the rat OB

In considering the classical scheme of the bulbar circuitry, the function of the PG seems to be dependent on the levels of sensory input, and, as this input increases, the activation of PG may act as an inhibitory feedback on mitral and tufted cells. We presume on the basis of the recent neuroanatomical data referred to above describing different types of PG that the heterogeneity of these interneurons reflects different functional roles. This variability could imply the possibility of establishing a fine-tuning of the entrance of olfactory information into the OB.

Two points should be considered in this regard. The first is the presence of synaptic contacts from the terminals of the sensory afferences on the gemmules of the type 1 PG and the lack of sensory contacts on those of type 2. This fact may define different temporal patterns of activation for the different groups of PG. The reception of sensory input may activate the type 1 PG in two different ways: 1) directly, through the reception of the glutamatergic synapses from the olfactory axon terminals in their dendrites, at the same time during which the dendrites of the mitral and tufted cells are activated, and 2) indirectly, through the dendrodendritic reception of glutamatergic synapses from the mitral and tufted cells previously activated by the olfactory axons. On the contrary, the reception of sensory information may activate the type 2 PG only in-

Fig. 4. Connectivity of the somatostatin (SOM)-containing periglomerular cells in the glomerular neuropil under the electron microscope. A,B: Consecutive ultrathin sections showing synaptic contacts (arrows) from the axon terminals of the olfactory nerve (ON) on a dendritic profile of a SOM-containing periglomerular cell (SOM). C: The dendrite of a SOM-containing periglomerular cell (SOM) receives, in the synaptic subcompartment of the glomerular neuropil, an asymmetrical synaptic contact (arrow) from a dendrite of a mitral or tufted cell (M/T). D: Dendrodendritic symmetrical contact (arrow) from a SOM-containing profile (SOM) on a putative mitral/tufted cell.

E,F: Consecutive ultrathin sections showing a symmetrical contact (arrows) from an axon (Ax) of unknown origin on a SOM-containing dendrite (SOM) that is located in the synaptic subcompartment of the glomerular neuropil. G,H: The dendritic profile of a SOM-containing periglomerular cell receives synaptic contacts from the olfactory nerve (ON; arrows). Postembedding immunogold detection of GABA demonstrates that the SOM-containing profiles are GABA immunonegative. Note the presence of colloidal gold in a myelinic axon (asterisks). Scale bars = 250 nm in A (applies to A,B); 250 nm in C,D; 250 nm in E (applies to E,F); 250 nm in G (applies to G,H).

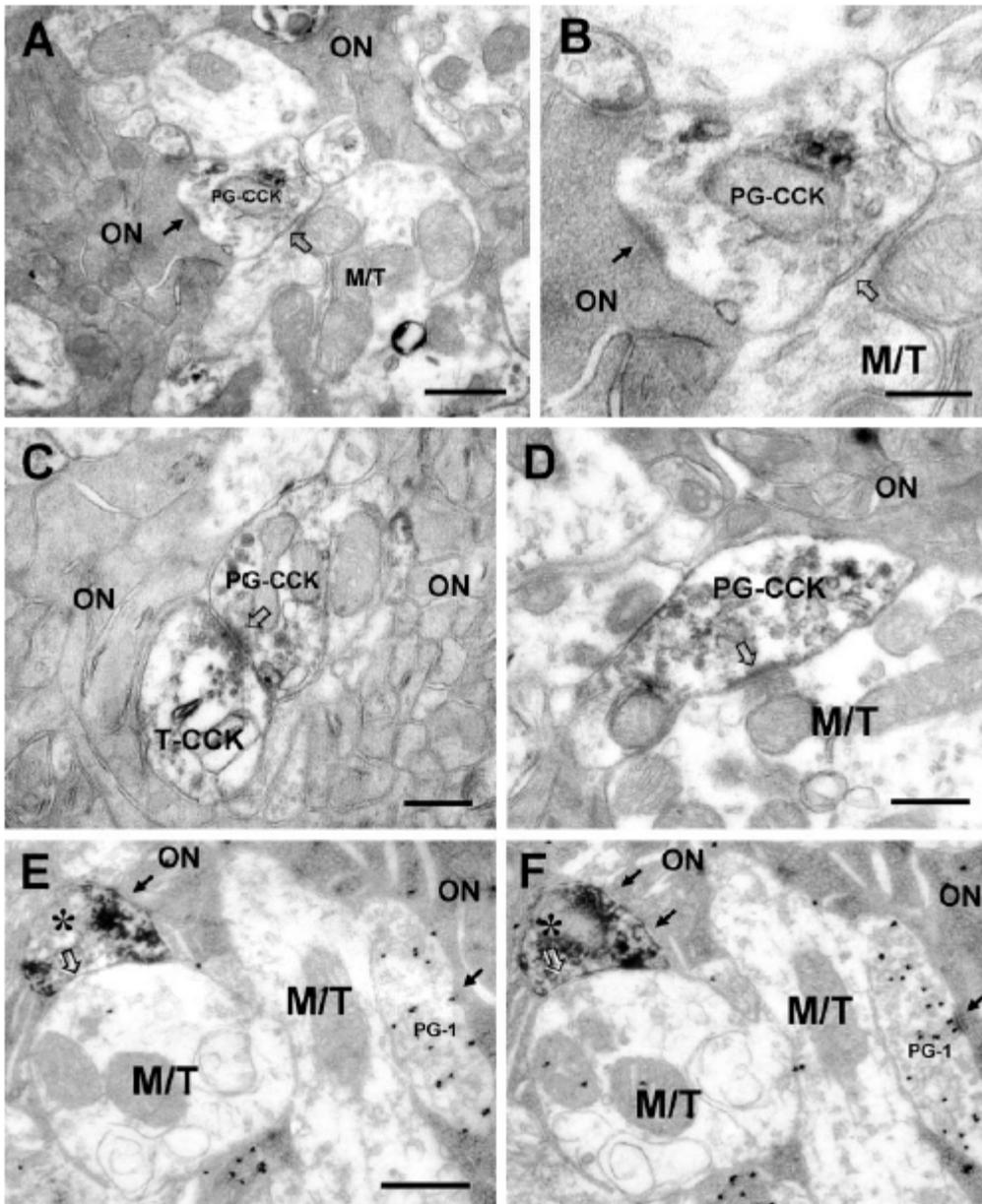


Fig. 5. A,B: Low and high magnifications show a dendritic profile of a CCK-containing periglomerular cell (PG-CCK) receiving an asymmetrical synaptic contact (solid arrows) from the olfactory nerve (ON). This profile makes a symmetrical synaptic contact (open arrows) upon a dendritic profile of a mitral/tufted cell (M/T). C: Dendritic profile of a CCK-containing periglomerular cell (PG-CCK) receiving an asymmetrical synaptic contact (arrow) from a dendrite of a CCK-containing tufted cell (T-CCK). ON, olfactory nerve. D: Dendritic profile of a CCK-containing periglomerular cell (PG-CCK) receiving an asymmetrical synaptic contact (arrow) from a dendrite of a CCK-immunonegative mitral/tufted cell (M/T). E,F: The dendritic profile of

a CCK-containing periglomerular cell (asterisks) receives synaptic contacts from the olfactory nerve (ON; solid arrows) and make a symmetrical contact (open arrows) upon a dendrite of a mitral/tufted cell. Postembedding immunogold detection of GABA demonstrates that the CCK-containing periglomerular cell is GABA immunonegative. Note the presence of colloidal gold in a gemmule of a GABAergic periglomerular cell that receives a synaptic contact from an axon of the olfactory nerve (ON; solid arrows) and, therefore, belongs to the type 1 (PG-1). Scale bars = 500 nm in A; 250 nm in B,E (applies to E,F); 300 nm in C,D.

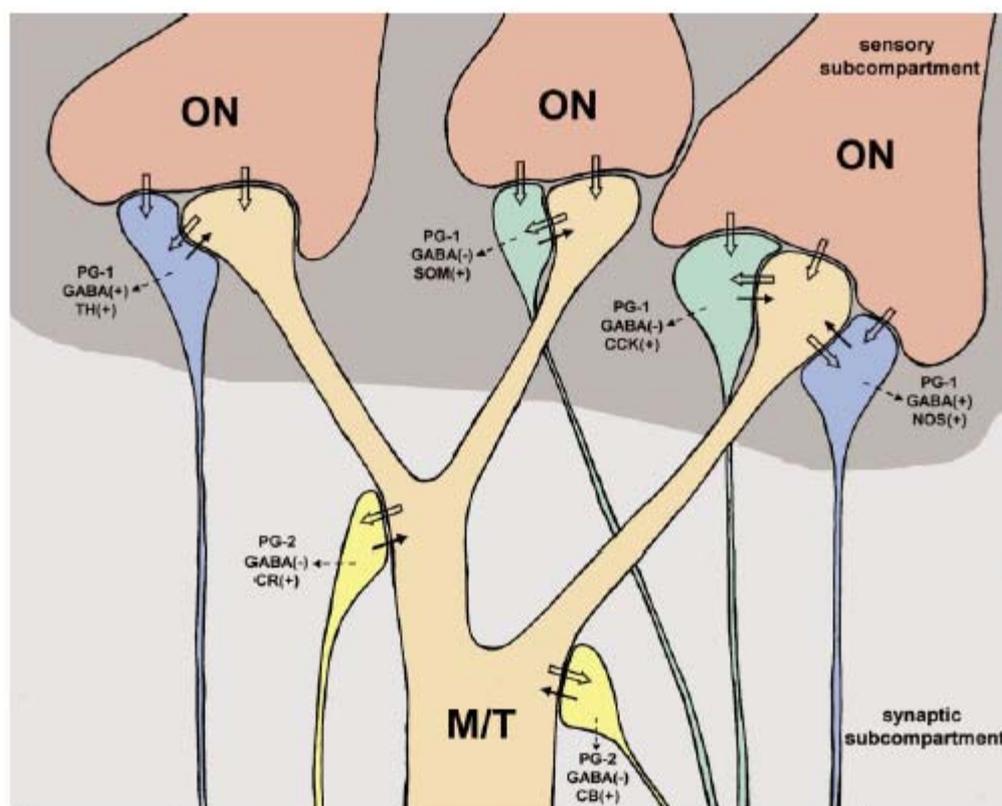


Fig. 6. Diagram summarizing the present data and previous reports. There is a high degree of complexity in the circuitry of the glomerular neuropil in the rat olfactory bulb. Periglomerular cells (PG) constitute a heterogeneous population integrated at least by two different types of cells. Type 1 PG (PG-1) extend their dendrites throughout the sensory and the synaptic subcompartments of the glomerular neuropil and receive synapses from the ON. This type is composed of at least two groups of neurons; the first is GABAergic (GABA⁺), and the second is GABA immunonegative (GABA⁻). The GABAergic group is composed of at least two subgroups; the first subgroup is dopaminergic and therefore tyrosine hydroxylase (TH)

immunopositive (TH⁺), and the second subgroup is nitroergic (NOS⁺). Moreover, the GABA-immunonegative group is also composed of at least two subgroups; the first subgroup expresses the neuropeptide CCK (CCK⁺), and the second subgroup expresses the neuropeptide SOM (SOM⁺). Type 2 PG (PG-2) restrict their dendrites to the synaptic subcompartment of the glomerular neuropil, so they do not receive synapses from the ON. This type includes two subgroups of GABA-immunonegative cells; the first expresses the calcium-binding protein calbindin D-28K (CB⁺) and the second calretinin (CR⁺). Solid arrows represent symmetrical synaptic contacts, and open arrows represent asymmetrical synaptic contacts.

directly, through the previous activation of the mitral/tufted cells contacting them.

The second point to discuss is the presence or absence of GABA in the type 1 and type 2 PG. For the rat OB, it has been described that the majority of type 1 PG are GABAergic (Kosaka et al., 1997, 1998). Nevertheless, our results demonstrate that the SOM- and CCK-containing PG, which we have included into type 1 on the basis of their connectivity with the olfactory axons, are GABA immunonegative. The neurotransmitter that these GABA-immunonegative PG use remains to be elucidated. The SOM- and CCK-containing PG, as well as those containing

CR and CB, make symmetrical synapses upon their targets, as shown by electron microscopy (Toida et al., 1998, 2000; present data), so, although they are GABA immunonegative, they could be inhibitory in nature. The presence of the inhibitor neurotransmitter glycine in their synaptic vesicles cannot be discarded, taking into account that Trombley and Shepherd (1994) have demonstrated electrophysiologically that glycine exerts potent inhibitory actions on bulbar neurons. Another candidate could be taurine, an amino acid structurally similar to GABA and glycine that has inhibitory effects in the bulbar circuitry (Belluzzi et al., 2004).

Functional involvement of SOM and CCK in the olfactory glomeruli

Numerous and different functions have been demonstrated for the peptides SOM and CCK in the brain. It has been reported that SOM, among its effects on neurotransmission, depresses glutamatergic excitatory postsynaptic currents in the hippocampus (Tallent and Siggins, 1997) via activation of SOM receptors present in glutamatergic elements, leading to a reduction of the release of glutamate (Boehm and Betz, 1997). In the olfactory glomeruli, SOM may exert a similar modulation of the glutamatergic transmission from the olfactory nerve terminals and from the dendrites of the mitral and tufted cells. It has been reported that the SOM receptor subtype 2(b) is presynaptically located in the axons of the olfactory nerve (Schindler et al., 1999), supporting an inhibitory modulation of the glutamatergic transmission from the sensory afferences at presynaptic level. Moreover, we have found in the present work that the SOM-containing PG innervate the sensory subcompartment of the glomerular neuropil, where the olfactory axons are present. In addition to this action, it has been documented that SOM modifies the release of a variety of neurotransmitters, including GABA, dopamine, noradrenaline, and serotonin (Gothert, 1980; Tanaka and Tsujimoto, 1981; Chesselet and Reisine, 1983; Hathway et al., 1998). All of these neurotransmitters are present in the glomerular circuitry: GABA and dopamine in a population of PG and noradrenaline and serotonin in centrifugal fibers from the locus coeruleus and dorsal raphe, respectively (Shepherd and Greer, 1998).

With regard to CCK, the expression of this peptide in dopaminergic neurons of certain brain areas has been well documented (Hökfelt et al., 1980). In these neurons, CCK modulates dopamine release at the presynaptic level, through the inhibitory regulation of dopamine D₂ autoreceptors (Tanganelli et al., 2001). There is an abundant population of dopaminergic PG in the rat OB (Halasz et al., 1977; Toida et al., 2000), and we have analyzed whether the CCK-containing PG were dopaminergic. The absence of colocalization of CCK and TH in the same PG demonstrates that CCK-containing PG are nondopaminergic. Nevertheless, we cannot rule out a presynaptic modulation of the dopamine release by CCK in the PG, because the gemmules of the CCK-containing PG are interspersed with the gemmules of the dopaminergic PG in the synaptic and sensory subcompartments of the glomerular neuropil. A function proposed for dopamine in the glomerular circuits is the presynaptic inhibition of the sensory afferences via activation of dopamine D₂ receptors present in the terminals of the olfactory axons (Koster et al., 1999; Wachowiak and Cohen, 1999; Berkowicz and Trombley, 2000; Ennis et al., 2001). Because the CCK-containing PG innervate the sensory subcompartment of the glomeruli, their gemmules are in close contact with the terminals of the olfactory axons containing dopamine D₂ receptors. Therefore, CCK could exert an inhibitory regulation on these receptors in the same way that Tanganelli et al. (2001) demonstrated in the nucleus accumbens. Other putative function of CCK in the central nervous system is the modulation of GABA release from GABAergic interneurons. For some brain regions, such as the striatum (Rakovska, 1995) and the hippocampus (Miller et al., 1997), it has been demonstrated that CCK increases GABA release from GABAergic terminals. We

cannot discard a similar action for CCK in the glomerular circuits, insofar as the distribution of the GABAergic PG matches well with the distribution of the CCK-containing PG in both the sensory and the synaptic subcompartments of the glomerular neuropil. Finally, CCK might exert a direct excitatory effect upon its targets, as has been reported for the striatum (Davidowa et al., 1995, 1997; Wu and Wang, 1996), hippocampus (Gronier and Debonnel, 1995), and thalamus (Cox et al., 1995). The synaptic targets of the CCK-containing PG are the mitral and tufted cells, but, in that this peptide is released extrasynaptically, the putative targets of the action of the CCK could be any other element taking part in the glomerular circuitry and expressing CCK receptors. Further analysis of the neuroanatomical distribution of CCK receptors in the OB is needed to clarify the functional involvement of this peptide in the bulbar circuits.

ACKNOWLEDGMENTS

Mouse antibody raised against CCK was provided by CURE/Digestive Diseases Research Center, Antibody/RIA Core, under NIH grant DK41301. The authors thank Dr. T.J. Gorsc for the generous gift of anti-SOM serum and Dr. Juan Nacher for helpful comments on the article.

LITERATURE CITED

- Aungst JL, Heyward PM, Puche AC, Karnup SV, Hayer A, Szabo G, Shipley MT. 2003. Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature* 426:623–629.
- Boiley MS, Puche AC, Shipley MT. 1999. Development of the olfactory bulb: evidence for glia-neuron interactions in glomerular formation. *J Comp Neurol* 415:423–448.
- Belluscio L, Lodovichi C, Feinstein P, Mombaeris P, Katz LC. 2002. Odorant receptors instruct functional circuitry in the mouse olfactory bulb. *Nature* 419:296–300.
- Belluzzi O, Puopolo M, Benedusi M, Kratskin I. 2004. Selective neuroinhibitory effects of taurine in slices of rat main olfactory bulb. *Neuroscience* 124:929–944.
- Berkowicz DA, Trombley PQ. 2000. Dopaminergic modulation at the olfactory nerve synapse. *Brain Res* 855:90–99.
- Boehm S, Betz H. 1997. Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors. *J Neurosci* 17:4066–4075.
- Chao TI, Kasa P, Wolff JR. 1997. Distribution of astroglia in glomeruli of the rat main olfactory bulb: exclusion from the sensory subcompartment of neuropil. *J Comp Neurol* 388:191–210.
- Chesselet MF, Reisine TD. 1983. Somatostatin regulates dopamine release in rat striatal slices and rat caudate nuclei. *J Neurosci* 3:232–236.
- Cox CL, Hugonard JR, Prince DA. 1995. Cholecystokinin depolarizes rat thalamic reticular neurons by suppressing a K⁺ conductance. *J Neurophysiol* 74:990–1000.
- Craspo C, Blasco-Ibañez JM, Britón JG, Alonso JR, Domínguez MI, Martínez-Guijarro J. 2000. Subcellular localization of m2 muscarinic receptors in GABAergic interneurons of the olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 12:3963–3974.
- Craspo C, Gracia-Llanos FJ, Blasco-Ibañez JM, Gutiérrez-Mecinas M, Marqués-Mari AI, Martínez-Guijarro J. 2003. Nitric oxide synthase containing periglomerular cells are GABAergic in the rat olfactory bulb. *Neurosci Lett* 348:151–154.
- Davidowa H, Albrecht D, Gabriel HJ, Heublein S, Wetzel K. 1986. Cholecystokinin excites neostriatal neurons in rats via CCKA or CCKB receptors. *Eur J Neurosci* 7:2364–2369.
- Davidowa H, Wetzel K, Vierig G. 1997. Effects of cholecystokinin agonists on striatal neurons are reduced by acetylcholine. *Peptides* 18:541–545.
- Ennis M, Zhou FM, Gombor KJ, Aroniadou-Anderjaska V, Hoyer A, Borrelli E, Zimmer LA, Margolis F, Shipley MT. 2001. Dopamine D2 receptor-mediated presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals. *J Neurophysiol* 86:2986–2997.

SOM- AND CCK-IMMUNOREACTIVE PERIGLOMERULAR CELLS

479

- Gøthert M. 1980. Somatostatin selectively inhibits noradrenaline release from hypothalamic neurons. *Nature* 288:86–88.
- Gronir B, Debennel G. 1995. CCKB receptors mediate CCK-8S-induced activation of dorsal hippocampus CA3 pyramidal neurons: an in vivo electrophysiological study in the rat. *Synapse* 21:158–168.
- Halasz N, Ljungdahl A, Hokfelt T, Johansson O, Goldstein M, Park D, Biberfeld P. 1977. Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. I. Immunohistochemical localization of monoamine synthesizing enzymes. Support for intrabulbar, periglomerular dopamine neurons. *Brain Res* 128:455–474.
- Hathway GJ, Emson PC, Humphrey PP, Kendrick KM. 1998. Somatostatin potently stimulates in vivo striatal dopamine and gamma-aminobutyric acid release by a glutamate-dependent action. *J Neurochem* 70:1740–1749.
- Hokfelt T, Biberfeld JF, Skirboll L, Iversen B, Goldstein M, Markey K. 1980. Evidence for coexistence of dopamine and CCK in meso-limbic neurons. *Nature* 285:476–478.
- Hsu SM, Rains L, Fanger H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29:577–580.
- Kasowski HJ, Kim H, Greer CA. 1999. Compartmental organization of the olfactory bulb glomerulus. *J Comp Neurol* 407:261–274.
- Kosaka K, Aika Y, Toida K, Heizmann CW, Hunziker W, Jacobowitz DM, Nagatsu I, Streit P, Visser TJ, Kosaka T. 1995. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. *Neurosci Res* 23:73–88.
- Kosaka K, Toida K, Margolis FL, Kosaka T. 1997. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb—II. Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals. *Neuroscience* 76:775–786.
- Kosaka K, Toida K, Aika Y, Kosaka T. 1998. How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res* 30:101–110.
- Kosaka K, Aika Y, Toida K, Kosaka T. 2001. Structure of intraglomerular dendritic tufts of mitral cells and their contacts with olfactory nerve terminals and calbindin-immunoreactive type 2 periglomerular neurons. *J Comp Neurol* 440:219–235.
- Kosaka T, Kosaka K. 2003. Neuronal gap junctions in the rat main olfactory bulb, with special reference to intraglomerular gap junctions. *Neurosci Res* 45:189–209.
- Koster NL, Normal AB, Richtand NM, Nickell WT, Puche AC, Paxley SK, Shipley MT. 1995. Olfactory receptor neurons express D2 dopamine receptors. *J Comp Neurol* 411:666–673.
- Liu WL, Shipley MT. 1994. Intrabulbar associational system in the rat olfactory bulb comprises cholecystokinin-containing tufted cells that synapse onto the dendrites of GABAergic granule cells. *J Comp Neurol* 346:541–558.
- Lantos TA, Góres TJ, Palkovits M. 1995. Immunohistochemical mapping of neuropeptides in the preamillary region of the hypothalamus in rats. *Brain Res Rev* 20:209–249.
- Miller KK, Hoffer A, Stoboda KR, Lupica CR. 1997. Cholecystokinin increases GABA release by inhibiting a resting K⁺ conductance in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 17:4994–5003.
- Murphy GJ, Glickfeld LL, Balsen Z, Isaacson JS. 2004. Sensory neuron signaling to the brain: properties of transmitter release from olfactory nerve terminals. *J Neurosci* 24:3023–3030.
- Pinching AJ, Powell TP. 1971. The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9:305–345.
- Puopolo M, Belluzzi O. 1998. Functional heterogeneity of periglomerular cells in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 10:1073–1083.
- Rakovska A. 1995. Cholecystokinin-GABA interactions in rat striatum. *Neuropeptides* 29:257–262.
- Schindler M, Humphrey PP, Lohrke S, Friauf E. 1999. Immunohistochemical localization of the somatostatin *sst2(b)* receptor splice variant in the rat central nervous system. *Neuroscience* 90:859–874.
- Serogy KB, Brecha N, Gall C. 1985. Distribution of cholecystokinin-like immunoreactivity in the rat main olfactory bulb. *J Comp Neurol* 238:373–383.
- Serogy K, Hokfelt T, Buchan A, Brown JC, Terenius L, Norman AW, Goldstein M. 1989. Somatostatin-like immunoreactivity in rat main olfactory bulb: extent of coexistence with neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase- and vitamin D-dependent calcium binding protein-like immunoreactivities. *Brain Res* 493:389–396.
- Shepherd GM, Greer CA. 1998. Olfactory bulb. In: Shepherd GM, editor. *The synaptic organization of the brain*, 4th ed. New York: Oxford University Press. p 159–203.
- Somogyi P, Hodgson AJ. 1985. Antisera to gamma-aminobutyric acid. III. Demonstration of GABA in Golgi-impregnated neurons and in conventional electron microscopic sections of cat striate cortex. *J Histochem Cytochem* 33:249–257.
- Takami S, el-Hawary MH, Czaizadei PP. 1990. Somatostatin-28-like immunoreactivity in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 525:333–337.
- Tallent MK, Siggins GR. 1997. Somatostatin depresses excitatory but not inhibitory neurotransmission in rat CA1 hippocampus. *J Neurophysiol* 78:3008–3018.
- Tanaka S, Tsujimoto A. 1981. Somatostatin facilitates the serotonin release from rat cerebral cortex, hippocampus and hypothalamus slices. *Brain Res* 208:219–222.
- Tanganelli S, Fuxe K, Antonelli T, O'Conner WT, Ferraro L. 2001. Cholecystokinin/dopamine/GABA interactions in the nucleus accumbens: biochemical and functional correlates. *Peptides* 22:1229–1234.
- Toida K, Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T. 1998. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: III. Structural features of calbindin D28K-immunoreactive neurons. *J Comp Neurol* 392:179–198.
- Toida K, Kosaka K, Aika Y, Kosaka T. 2000. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb—IV. Intraglomerular synapses of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons. *Neuroscience* 101:11–17.
- Treloar HB, Feinstein P, Mombaerts P, Greer CA. 2002. Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *J Neurosci* 22:2469–2477.
- Trombley PQ, Shepherd GM. 1994. Glycine exerts potent inhibitory actions on mammalian olfactory bulb neurons. *J Neurophysiol* 71:761–767.
- Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nunez JM, Vasshall LB, Axel R. 1994. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79:981–991.
- Wachowiak M, Cohen LB. 1999. Presynaptic inhibition of primary olfactory afferents mediated by different mechanisms in lobster and turtle. *J Neurosci* 19:8808–8817.
- Wu T, Wang HL. 1995. The excitatory effect of cholecystokinin on rat neostriatal neurons: ionic and molecular mechanisms. *Eur J Pharmacol* 307:125–132.
- Xu F, Liu N, Kida I, Rothman DL, Hyder F, Shepherd GM. 2003. Odor maps of aldehydes and esters revealed by functional MRI in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11029–11034.

SHORT COMMUNICATION

Soluble guanylyl cyclase appears in a specific subset of periglomerular cells in the olfactory bulb

Maria Gutiérrez-Mecinas, Carlos Crespo, José Miguel Blasco-Ibáñez, Francisco Javier Gracia-Llanes, Ana Isabel Marqués-Mari and Francisco José Martínez-Guijarro
Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, Street Dr Moliner, 50 E-46100, Burjassot, Spain

Keywords: cGMP, nitric oxide, olfaction, olfactory glomeruli, rat

Abstract

In the brain, nitric oxide acts as an atypical messenger in cellular nonsynaptic transmission. In the olfactory bulb, this gas is produced at the level of the olfactory glomeruli by a subpopulation of periglomerular cells that participates in the first synaptic relay of the olfactory information between the olfactory nerve and the dendritic tufts of principal cells. It has been proposed that nitric oxide modulates intraglomerular synaptic integration of sensory inputs, but its specific role in the glomerular circuitry remains to be understood. In this article, we demonstrate that, in the glomerular circuits, a specific subset of periglomerular cells, most of them expressing the calcium binding protein calbindin D-28 k, expresses the $\beta 1$ subunit of the soluble guanylyl cyclase. These cells could be the targets for the action of nitric oxide at the glomerular level via activation of soluble guanylyl cyclase and production of cGMP.

Introduction

Nitric oxide (NO) is a gaseous messenger that plays major roles in mediating cellular nonsynaptic transmission in the nervous system. In the brain, a population of neurons that contains the neuronal isoform of the nitric oxide synthase (NOS) produces this gas, and the cerebellum and olfactory bulb (OB) are the rat brain regions with the highest levels of NOS expression (Bredt *et al.*, 1991; Vincent & Kimura, 1992). In the OB, it has been reported that NO influences the processing of the olfactory information at the level of the first synaptic relay of the sensory information between the axon terminals of the olfactory nerve and the apical portions of the dendritic tufts of mitral and tufted cells (the principal cells) (Breer & Shepherd, 1993; Hopkins *et al.*, 1996). This relay takes place in the olfactory glomeruli and is modulated by inhibitory interneurons that surround each olfactory glomerulus and are called periglomerular cells (PG) (reviewed in Shepherd & Greer, 1998). A large population of PG contains NOS and therefore produces NO (Croul-Ottman & Brunjes, 1988; Davis, 1991). Although it has been postulated that the NO produced by these interneurons modulates intraglomerular synaptic integration of sensory inputs (Breer & Shepherd, 1993), its specific role in the glomerular circuits remains to be understood. Even, at present, the targets for this action of NO have not been elucidated.

Under biological conditions, NO interacts rapidly with the heme groups in haemoproteins such as soluble guanylyl cyclase (sGC) or haemoglobin among others (Davis *et al.*, 2001). The binding of NO to the heme group of the sGC leads to a 200-fold increase in the activity of this enzyme increasing, consequently, the production of the second messenger cGMP (Humbert *et al.*, 1990; Skone & Marletta, 1994). In the brain, the activation of sGC and the production of cGMP is the

pathway by which NO exerts most of its physiological effects (Krumenacker *et al.*, 2004). Therefore, the detection of sGC in the tissue is a reliable tool to stain and identify putative targets for NO action (Lucas *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2004).

The enzyme sGC is a heterodimer with two subunits, α and β (Kamizaki *et al.*, 1986), and each subunit has two isoforms ($\alpha 1$ and $\alpha 2$ or $\beta 1$ and $\beta 2$). Nevertheless, only the dimerization of $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits accounts for the basal and NO-stimulated sGC activity (Krumenacker *et al.*, 2004). Recently, the distribution of $\alpha 1$ and $\beta 1$ has been described in the rat brain, showing that sGC is organized as active $\alpha 1/\beta 1$ functional heterodimers (Ding *et al.*, 2004). This fact makes possible the immunocytochemical staining of the NO targets by using antibodies against either the $\alpha 1$ or the $\beta 1$ subunits.

To understand how NO affects the integration of the intraglomerular processing of olfactory inputs, we have decided to investigate the elements of the circuitry of the olfactory glomeruli that contains sGC, analysing the expression of its $\beta 1$ subunit. This investigation includes the neurochemical characterization of the $\beta 1$ -containing elements and the analysis of their synaptology under the electron microscope.

Materials and methods

Ten adult female Wistar rats were deeply anesthetized with 4% chloral hydrate in physiological saline (1 mL/100 g body weight) and intra-aortically perfused, first with saline for one minute, followed by 50 mL of 3.8% (v/v) acrolein and 2% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 and then 450 mL of 2% (w/v) paraformaldehyde in PB. All the procedures were in accordance with the guidelines of the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and conformed to NIH guidelines for the use and care of animals.

After perfusion, 60- μ m-thick transverse sections from the OB were cut on a vibratome, cryoprotected, freeze-thawed to enhance antibody

Correspondence: Dr Carlos Crespo, as above.
E-mail: Carlos.Crespo@uv.es

Received 8 October 2004; revised 15 December 2004; accepted 17 December 2004

doi:10.1111/j.1460-9568.2005.03960.x

1444 M. Gutiérrez-Mecinas *et al.*

penetration, treated with 1% NaBH₄ in PB for 30 min, and processed for β 1-immunocytochemistry. The detection of β 1 was made using the avidin-biotin-immunoperoxidase method as previously described (Crespo *et al.*, 2000). Polyclonal rabbit anti- β 1 serum was purchased from Cayman (#160897) and used diluted 1 : 1000 in PB containing 1% normal goat serum. After immunocytochemistry, sections were treated with 1% osmium tetroxide (1 h), stained with 1% uranyl acetate (90 min) and flat-embedded in Durcupan (Fluka AG) between slides and coverslips. Flat-embedded sections were examined under the light microscope and the selected ones re-embedded in Durcupan and cut on an ultramicrotome. Serial ultra-thin sections were mounted on single-slot Formvar-coated nickel grids, stained with lead citrate and analysed under the electron microscope.

In order to characterize neurochemically the β 1-immunopositive PG, we used double immunofluorescence for the detection of β 1

combined with different markers that stain different subpopulations of PG, including NOS, tyrosine hydroxylase (TH), GABA, calretinin (CR), and calbindin D-28 k (CB). For the colocalization of β 1 with NOS, GABA, CR and CB, the sections were treated as previously described (Gracia-Lanes *et al.*, 2003). The dilution of the primary antibodies was as follows: 1 : 1000 for the rabbit anti- β 1 antiserum; 1 : 500 for the mouse anti-NOS (Sigma); 1 : 5000 for the mouse anti-GABA (Swant); 1 : 2000 for the mouse anti-CR (Swant); 1 : 2500 for the mouse anti-CB (Swant). Goat anti-rabbit Cy3-conjugated IgG (Jackson; 1 : 200) was used to label the β 1-containing elements and goat anti-mouse Cy2-conjugated IgG (Jackson; 1 : 200) was used to stain the other markers. For the colocalization of β 1 with TH, both primary antibodies had the same origins and therefore a sequential method using Fab fragments of IgG was used as follows. Sections were incubated at room temperature in (i) rabbit anti- β 1 serum (24 h);

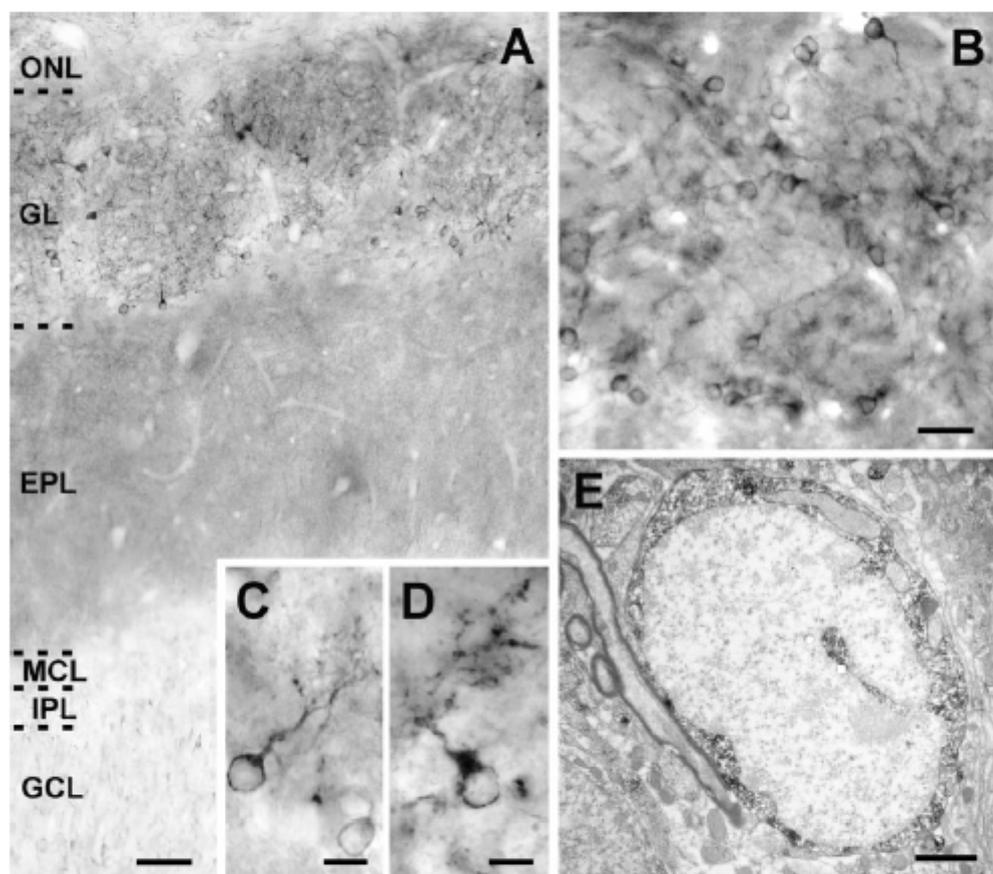


FIG. 1. (A) Semi-panoramic view of the β 1-containing elements in the rat OB. A population of β 1-containing elements is homogeneously distributed throughout the glomerular layer (GL). Moreover, radially orientated dendrites of granule cells display weak staining in the granule cell layer (GCL) and internal plexiform layer (IPL). (B) The cells surrounding the olfactory glomeruli have the morphology of PG and their dendrites innervate the glomerular neuropil. (C and D) Details of the morphology of the β 1-immunopositive PG. (E) Ultrastructural features of β 1-containing PG. Note the narrow ring of cytoplasm, the large nuclear region and the nuclear indentation. HPL, external plexiform layer; GCL, granule cell layer; GL, glomerular layer; IPL, internal plexiform layer; MCL, mitral cell layer; ONL, olfactory nerve layer. Scale bars, 50 μ m (A); 25 μ m (B); 10 μ m (C and D); 1 μ m (E).

© 2005 Federation of European Neuroscience Societies, *European Journal of Neuroscience*, 21, 1443–1448

(ii) goat anti-rabbit Fab fragments (Jackson; 1 : 100; 2 h); (iii) donkey anti-goat Cy3-conjugated IgG (Jackson; 1 : 300; 2 h); (iv) rabbit anti-TH serum (Affinity; 1 : 7000; 24 h) and (v) donkey anti-rabbit Cy2-conjugated IgG (Jackson; 1 : 300; 2 h). Finally, the sections were mounted on gelatin-coated slides and coverslipped with an anti-fading medium. Double-labelled sections were analysed under Laser Scanning Confocal Microscopy. The company of origin tested the specificity for each antiserum used in this study. Additional controls were carried out as previously described (Crespo *et al.*, 2000).

Results

In the OB, $\beta 1$ -immunoreactivity appeared exclusively in interneurons, whereas the principal cells were always $\beta 1$ -immunonegative (Fig. 1A). In the olfactory glomeruli, $\beta 1$ appeared in a population of small cells (6–9 μm in diameter) homogeneously distributed throughout the olfactory glomeruli. These cells showed either round or ovoid somata with a dendrite innervating an olfactory glomerulus and ramifying profusely inside the glomerular neuropil (Fig. 1B). Gemmules and protrusions were abundant in the distal portions of the dendritic branches. This morphology clearly corresponded to PG (Fig. 1C and D). Electron microscopy confirmed that the $\beta 1$ -containing cells had two typical features of PG; a narrow ring of cytoplasm and a large nucleus that showed a deep nuclear indentation (Fig. 1E). The other neuronal types present in the periglomerular region of the olfactory glomeruli, i.e. superficial short-axon cells and external tufted cells, did not contain $\beta 1$ -immunoreactivity. Apart from the staining found in the olfactory

glomeruli, $\beta 1$ -containing processes appeared projecting radially in the granule cell layer (Fig. 1A). These processes corresponded to dendritic branches of granule cells that showed weak $\beta 1$ -immunoreactivity.

PG do not constitute a homogeneous population of interneurons and two different types, differing in their neurochemistry and connectivity, have been described in the rat OB (Kosaka *et al.*, 1997, 1998). Type 1 PG receive synaptic contacts from the olfactory axons and are GABAergic. This type includes two nonoverlapping subsets of cells; a first group is dopaminergic and therefore TH-immunopositive; and a second one is nitergic and reactive to the histochemical technique of the NADPH-diaphorase (Crespo *et al.*, 2005) and to the NOS immunocytochemistry. Type 2 PG do not receive synapses from the olfactory nerve axons and are GABA- and GAD-immunonegative. This type also includes two nonoverlapping groups of PG; a first group that expresses CR; and a second one that expresses CB (Kosaka *et al.*, 1997, 1998; Toida *et al.*, 1998). We have investigated whether the population of $\beta 1$ -containing PG correspond to types 1 or 2, to understand the role of NO and sGC in the bulbar circuitry.

Focusing our attention on the type 1 PG, there was not colocalization of $\beta 1$ with NOS (0 NOS-immunopositive cells in 322 $\beta 1$ -containing cells) (Fig. 2A). Moreover, there was not colocalization of $\beta 1$ with TH (1 TH-immunopositive cell in 402 $\beta 1$ -containing cells) (Fig. 2B). Although NOS and TH stain the two major subpopulations of type 1 PG described at present, colocalization of $\beta 1$ with GABA was also investigated. The $\beta 1$ -containing PG analysed were GABA-immunonegative (489 GABA-immunonegative cells in 490 $\beta 1$ -containing cells) (Fig. 2C) and therefore we can conclude that most if not all of the $\beta 1$ -containing PG do not belong to the type 1 PG.

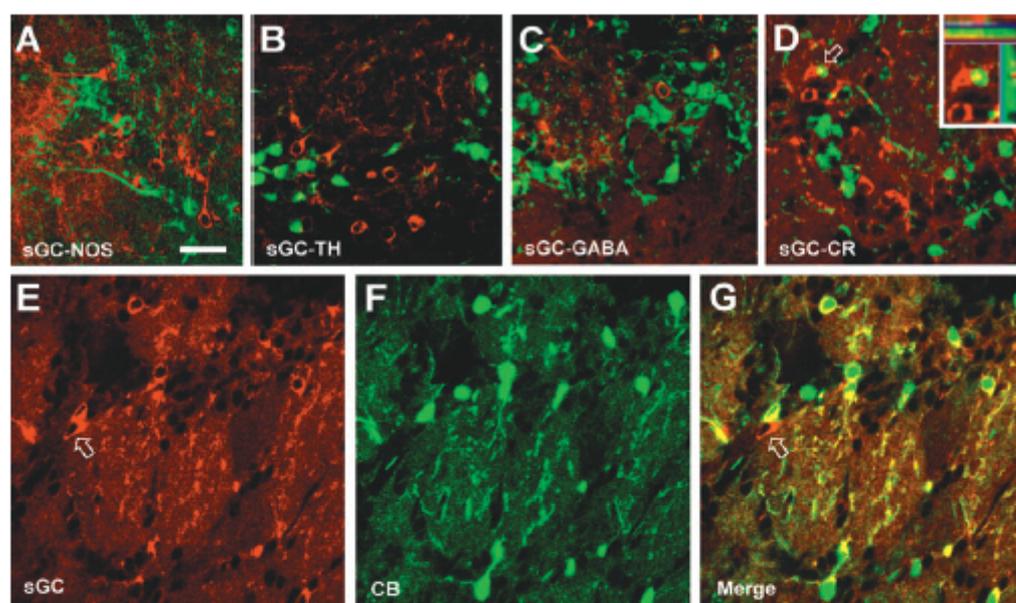


FIG. 2. Neurochemical characterization of the $\beta 1$ -containing PG by using $\beta 1$ /NOS, $\beta 1$ /TH, $\beta 1$ /GABA, $\beta 1$ /CR and $\beta 1$ /CB double immunofluorescence and Laser Scanning Confocal Microscopy. Cy3 (red) labels $\beta 1$ -containing PG and Cy2 (green) stains the other markers; NOS, TH, GABA, CR and CB. (A–D) The $\beta 1$ -containing PG do not contain NOS (A), TH (B), GABA (C) or CR (D). Occasionally, yellow points appear as punctual superposition of positive elements. Orthogonal reconstruction of these regions from the optical section series demonstrates the superposition of positive elements (insert in D; the example shown in this panel, at high magnification, corresponds to the region indicated in D with an open arrow). (E–G) Most of the $\beta 1$ -containing PG contain CB. Arrow points to a $\beta 1$ -containing periglomerular cell that does not contain CB. Scale bar, 25 μm .

1446 M. Gutiérrez-Mecinas *et al.*

In the same way, colocalization of $\beta 1$ with the markers of the type 2 PG (CR and CB) was also investigated. These experiments demonstrated that $\beta 1$ -immunopositive PG did not express CR (472 CR-immunonegative cells in 472 $\beta 1$ -containing cells) (Fig. 2D). On the contrary, most of the $\beta 1$ -immunopositive PG did express CB (Fig. 2E–G). Quantitative analysis indicated that 82% of the $\beta 1$ -containing PG were CB-immunopositive ($n = 420$) and 87% of the CB-containing PG were $\beta 1$ -immunopositive ($n = 396$).

Analysing the dendrites of the $\beta 1$ -containing PG at the electron microscope, a segregation of the $\beta 1$ -containing profiles was found within the glomerular neuropil. The glomerular neuropil is organized in two different territories or subcompartments; the synaptic subcompartment lacks olfactory nerve terminals and the sensory one contains the olfactory afferences (Chao *et al.*, 1997; Kasowski *et al.*, 1999). Most of the $\beta 1$ -containing profiles were located throughout the synaptic subcompartment of the glomerulus and avoided the sensory subcompartment occupied by the axon terminals of the olfactory nerve (Fig. 3). Therefore, most of the profiles did not receive synaptic contacts from the sensory afferences, although a few sporadic synapses from

olfactory axons onto $\beta 1$ -containing gemmules were found in the boundary between both glomerular subcompartments. This distribution is similar to the distribution of the processes of the CB-containing PG previously described by Tojida *et al.* (1998). The connectivity of the $\beta 1$ -containing elements in the synaptic subcompartment included dendrodendritic synapses with principal cells (Fig. 4A and B). These contacts included symmetrical synaptic contacts upon mitral and tufted cells and asymmetrical synaptic contacts from them. Some of these contacts formed reciprocal pairs (Fig. 4C). Moreover, some $\beta 1$ -containing dendrites made symmetrical synapses upon dendritic profiles different from principal cells, which probably belong to other PG (Fig. 4D), or receive symmetrical synapses from them.

Discussion

In the brain, the activation of sGC and the production of cGMP is the pathway by which NO exerts most of its physiological effects in cell signalling (Krumenacker *et al.*, 2004). NO is a diffusible gas that, in the olfactory glomerulus, can diffuse from the dendrites of the PG that

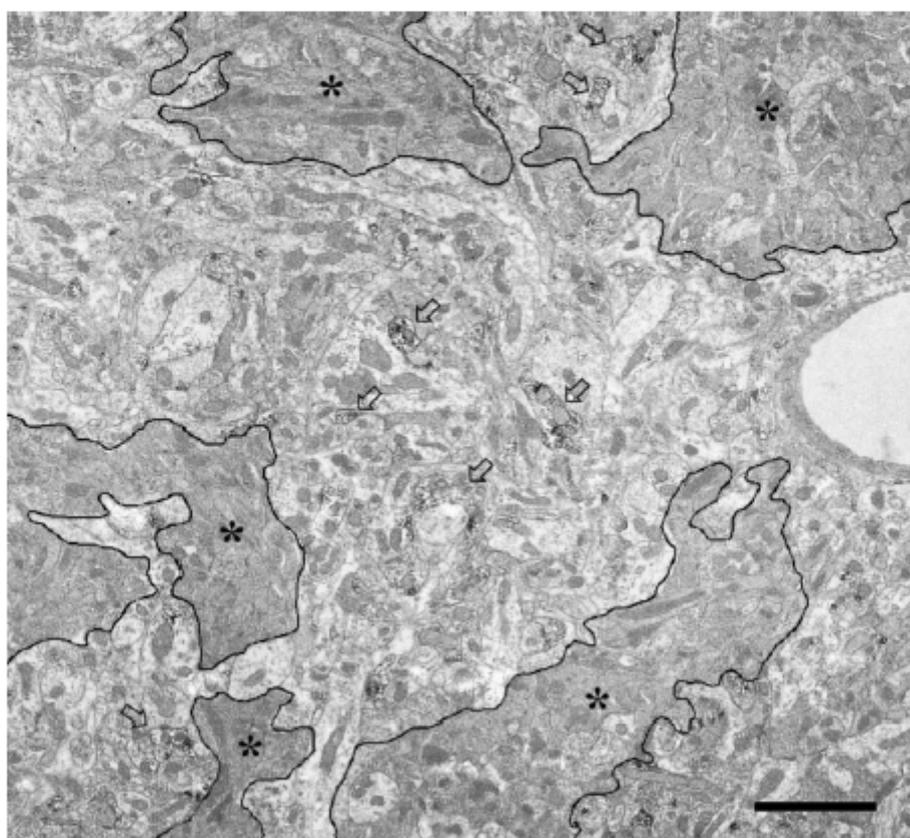


FIG. 3. Semi-panoramic view of the distribution of $\beta 1$ -containing elements in the glomerular neuropil under the electron microscope. $\beta 1$ -containing elements (open arrows) are mainly distributed throughout the synaptic subcompartment of the glomerular neuropil, avoiding the sensory one occupied by the olfactory nerve terminals (asterisks). Scale bar, 2 μ m.

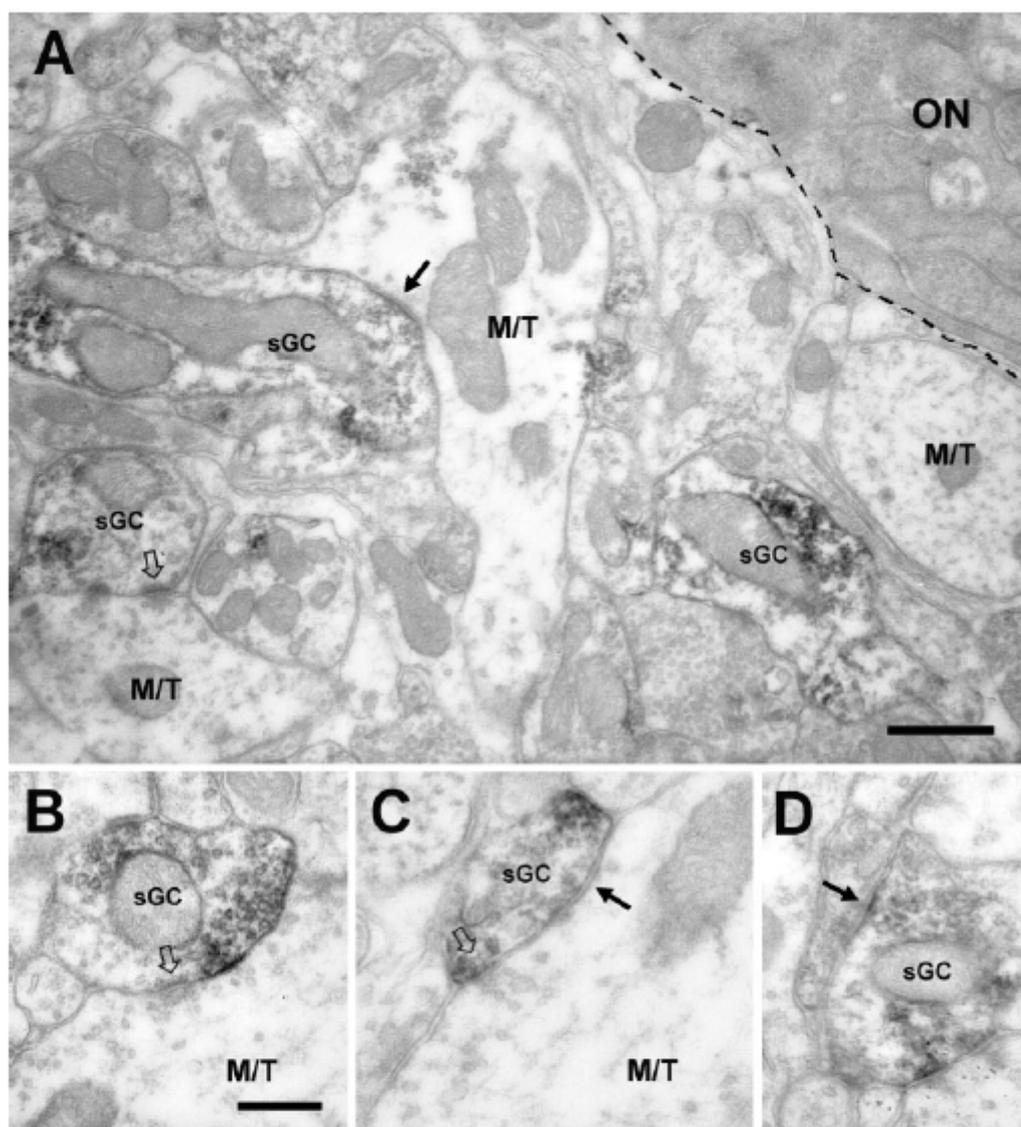


FIG. 4. (A) The $\beta 1$ -containing profiles (sGC) establish synaptic relationships with the principal cells (mitral and tufted cells, M/T) in the synaptic subcompartment of the glomerular neuropil. The dashed line delimitates the boundary between the synaptic subcompartment and the sensory one containing the olfactory nerve axons (ON). An immunopositive dendrite makes a symmetrical synaptic contact (arrow) on a dendritic profile of a M/T. Another receives an asymmetrical synaptic contact (open arrow) from a M/T. (B) A M/T makes a dendrodendritic asymmetrical synaptic contact (open arrow) on a $\beta 1$ -containing profile (sGC). (C) Symmetrical synaptic contact from a profile containing sGC on a M/T (arrow) and asymmetrical synaptic contact from a M/T on a sGC-immunopositive profile (open arrow) forming a reciprocal pair. (D) Dendrodendritic symmetrical contact (arrow) from a $\beta 1$ -containing gemmule (sGC) upon a profile of another putative PG. Scale bars, 400 nm (A); 250 nm (B–D).

produce it to the whole glomerular neuropil. Taking into account the half-life of NO, it could act in a paracrine manner upon all the elements taking part in the glomerular circuitry that include (i) olfactory nerve

terminals; (ii) tufts of the mitral and tufted cells and (iii) PG. In this regard, it has been hypothesized that NO could diffuse to axon terminals of olfactory nerve activating the production of cGMP and then,

influence the entrance of sensory information (Breer & Shepherd, 1993). It has also been hypothesized a direct action of NO upon mitral cells, attributing a role to NO in the formation of the olfactory memory mediated by the activation of sGC and the production of cGMP (Kendrick *et al.*, 1997). We have not found $\beta 1$ -immunoreactivity in olfactory axon terminals or in principal cells of the rat OB. Therefore, we conclude that the action of NO in intercellular signalling mediated by the NO/cGMP pathway, only occurs upon interneurons in the olfactory glomeruli, and these interneurons are exclusively PG.

It is interesting to note that not all of the PG are sensitive to the action of NO. On the contrary, our data show that the majority of these interneurons are not responsive to the gas, at least through the NO/cGMP pathway. The NO/cGMP pathway does not affect type 1 PG; the non-colocalization of NOS and $\beta 1$ in any PG demonstrates that NO has not an autocrine effect upon the PG that produce it. In the same way, the lack of $\beta 1$ -immunoreactivity in the TH-containing PG indicates that the dopaminergic PG are not affected by NO through the NO/cGMP pathway. The lack of sGC in the dopaminergic PG does not exclude other putative actions of NO in the dopaminergic circuits. Kiss *et al.* (2004) elegantly demonstrate an inhibitory effect of NO on the dopamine transporter that, probably, is not mediated by the NO/cGMP pathway. Therefore, we cannot exclude a similar direct effect on the dopaminergic PG. The type 2 PG that contain CR are not targets for NO and only the specific population of type 2 PG that contain CB seems to be $\beta 1$ -immunopositive and therefore sensitive to NO through the NO/cGMP pathway. Our results reinforce recent anatomical descriptions that show the neurochemical heterogeneity of PG and demonstrate the functional heterogeneity of these interneurons. A specific set of GABAergic NOS-containing PG is specialized in the synthesis of NO (Crespo *et al.*, 2003), and another specific set of GABA-immunonegative PG is specialized in responding to this gas synthesizing cGMP (present data).

Most of the $\beta 1$ -containing PG are restricted to the synaptic subcompartment of the glomerular neuropil and therefore do not receive synaptic contacts from the olfactory axons. On the contrary, NOS-containing PG are GABAergic and belong to the type 1 PG (Crespo *et al.*, 2003) that receive synapses from the olfactory axons. This circuitry implicates that the production of NO could take place in the gemules of the NOS-containing PG, as a response to the reception of synapses from the olfactory nerve in particular conditions. In turn, a set of PG that does not receive sensory afferences and the set of PG that produces NO are capable of communicating by using nonsynaptic transmission. Therefore, the former set of PG can respond to the entrance of sensory input producing cGMP, although they do not receive sensory afferences. In this way, two subgroups of type 1 and type 2 PG, with a clear segregation in the glomerular neuropil and different connectivity, are closely interrelated through the nonsynaptic messenger NO. These data show a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission in the OB. Future investigations are required to understand what this link means in the functional organization of the olfactory glomeruli.

Acknowledgements

Supported by the Spanish MCYT-FEDER (BF2001-3186) and Generalitat Valenciana; GV04A-076 and Grup03/119.

Abbreviations

CB, calbindin D-28 k; CR, calretinin; M/T, mitral and tufted cells; NO, nitric oxide; NOS, neuronal isoform of the nitric oxide synthase; OB, olfactory bulb; PG, periglomerular cell; sGC, soluble guanylyl cyclase; TH, tyrosine hydroxylase.

References

- Bredt, D.S., Glatt, C.E., Hwang, P.M., Fagan, M., Dawson, T.M. & Snyder, S.H. (1991) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, **7**, 615–624.
- Breer, H. & Shepherd, G.M. (1993) Implications of the NO/cGMP system for olfaction. *Trends*, **16**, 5–9.
- Chao, T.I., Kasa, P. & Wolff, J.R. (1997) Distribution of astroglia in glomeruli of the rat main olfactory bulb: exclusion from the sensory subcompartment of neuropil. *J. Comp. Neurol.*, **388**, 191–210.
- Crespo, C., Blasco-Ibáñez, J.M., Britón, J.G., Alonso, J.R., Domínguez, M.I. & Martínez-Guajano, F.J. (2000) Subcellular localization of m2 muscarinic receptors in GABAergic interneurons of the olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 3963–3974.
- Crespo, C., Gracia-Llanes, F.J., Blasco-Ibáñez, J.M., Gutiérrez-Mecinas, M., Marqués-Marí, A.I. & Martínez-Guajano, F.J. (2003) Nitric oxide synthase containing periglomerular cells are GABAergic in the rat olfactory bulb. *Neurosci. Lett.*, **349**, 151–154.
- Crosl-Ortman, C.E. & Baumjen, P.C. (1988) NADPH diaphorase staining within the developing olfactory bulbs of normal and unilaterally odor-deprived rats. *Brain Res.*, **460**, 323–328.
- Davis, B.J. (1991) NADPH-diaphorase activity in the olfactory system of the hamster and rat. *J. Comp. Neurol.*, **314**, 493–511.
- Davis, K.L., Martin, E., Turko, I.V. & Murad, F. (2001) Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**, 203–236.
- Ding, J.D., Buzette, A., Nedvetický, P.I., Schmidt, H.H.W. & Weinberg, R.J. (2004) Distribution of soluble guanylyl cyclase in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **472**, 437–448.
- Gracia-Llanes, F.J., Crespo, C., Blasco-Ibáñez, J.M., Marqués-Marí, A.I. & Martínez-Guajano, F.J. (2003) VIP-containing deep short-axon cells of the olfactory bulb innervate interneurons different from granule cells. *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 1751–1763.
- Hopkins, D.A., Steinbusch, H.W., Markenink-van Iersum, M. & De Vente, J. (1996) Nitric oxide synthase, cGMP, and NO-mediated cGMP production in the olfactory bulb of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **375**, 641–658.
- Humbert, P., Nincomand, F., Fischer, G., Mayer, B., Koedling, D., Hirsch, K.D., Gausepohl, H., Frank, R., Schultz, G. & Bohme, E. (1990) Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoadfinity chromatographic method. *Eur. J. Biochem.*, **190**, 273–278.
- Kamizaki, Y., Sahel, S., Nakane, M., Palmieri, J.A., Kuno, T., Chang, B.Y., Waldman, S.A. & Murad, F. (1986) Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J. Biol. Chem.*, **261**, 7236–7241.
- Kasowski, H.J., Kim, H. & Greer, C.A. (1999) Compartmental organization of the olfactory bulb glomerulus. *J. Comp. Neurol.*, **407**, 261–274.
- Kendrick, K.M., Guevara-Guzman, R., Zorrilla, J., Hinton, M.R., Broad, K.D., Mimmack, M. & Olszura, S. (1997) Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature*, **388**, 670–674.
- Kiss, J.P., Szilá, G. & Vizi, E.S. (2004) Inhibitory effect of nitric oxide on dopamine transporters: interneuron communication without receptors. *Neurochem. Int.*, **45**, 485–489.
- Kosaka, K., Toida, K., Aika, Y. & Kosaka, T. (1998) How simple is the organization of the olfactory glomerulus? the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci. Res.*, **30**, 101–110.
- Kosaka, K., Toida, K., Margolis, F.L. & Kosaka, T. (1997) Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb – II. Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals. *Neuroscience*, **76**, 775–786.
- Kuonenacker, J.S., Hanafy, K.A. & Murad, F. (2004) Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res. Bull.*, **62**, 505–515.
- Lucas, K.A., Pinar, G.M., Kazerooni, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schultz, S., Chapek, K.P. & Waldman, S.A. (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.*, **52**, 375–413.
- Shepherd, G.M. & Greer, C.A. (1998) Olfactory Bulb. In Shepherd, G.M. (Ed), *The synaptic organization of the brain*, 4th Edn. Oxford University Press, New York, pp. 159–203.
- Stone, J.R. & Marletta, M.A. (1994) Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, **33**, 636–640.
- Toida, K., Kosaka, K., Heizmann, C.W. & Kosaka, T. (1998) Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. III. Structural features of calbindin D28K-immunoreactive neurons. *J. Comp. Neurol.*, **392**, 179–198.
- Vincent, S.R. & Kimura, H. (1992) Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, **46**, 755–784.

Distribution of D2 dopamine receptor in the olfactory glomeruli of the rat olfactory bulb

María Gutiérrez-Mecinas, Carlos Crespo, José Miguel Blasco-Ibáñez, Francisco Javier Gracia-Llanes, Ana Isabel Marqués-Mari, Juan Nácher, Emilio Varea and Francisco José Martínez-Guijarro
Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, E-46100, Burjassot, Spain

Keywords: dopaminergic cells, mitral/tufted cells, olfaction, olfactory nerve, periglomerular cells, Wistar rats

Abstract

Dopamine plays key roles in the processing of the olfactory information that takes place in the olfactory glomeruli. Previous studies using autoradiography demonstrate that, at the glomerular level, these actions are mainly mediated via activation of D2 dopamine receptors. Moreover, it has been suggested that D2 receptors could be present in the olfactory nerve, where they might modulate the entrance of olfactory input into the brain. Nevertheless, the precise subcellular localization of D2 receptors in the glomerular neuropil has not been investigated. In this report, we show the subcellular distribution of D2 receptors in the glomerular circuits of Wistar rats, using pre-embedding immunogold-silver labelling and electron microscopy. Present results demonstrate for the first time the presence of D2 dopamine receptors into the terminals of the olfactory axons. In addition, we demonstrate that D2 receptors are located into presynaptic elements of the glomerular neuropil other than the olfactory axons. These elements include the dendrites of the mitral/tufted cells and the dendrites of a subset of periglomerular cells that are GABAergic and dopaminergic. This distribution pattern provides anatomical support for a wide range of actions of dopamine in the glomerular circuits through presynaptic mechanisms mediated by D2 receptors. These actions would include: (i) modulation of the glutamate release from the olfactory axons to the dendrites of mitral/tufted cells and periglomerular cells; (ii) modulation of glutamatergic synapses from the dendrites of mitral/tufted cells to the dendrites of periglomerular cells and (iii) modulation of the neurotransmission from a subset of GABAergic/dopaminergic periglomerular cells to mitral/tufted cells.

Introduction

The first synaptic relay of the olfactory information in the mammalian brain occurs in the olfactory bulb (OB), and takes place in distinctive spherical structures of neuropil named olfactory glomeruli (Shepherd & Greer, 1998). A large population of dopaminergic juxtglomerular neurons innervates each olfactory glomerulus and modulates the processing of the olfactory information (Halasz *et al.*, 1981). It has been reported that dopamine influences the transmission of the olfactory input (Hsis *et al.*, 1999; Berkowicz & Trombley, 2000) and modulates the activity of the bulbar mitral cells (output neurons) (Duchamp-Viret *et al.*, 1997). Nevertheless, detailed aspects of the action of dopamine in the glomerular circuits should be further clarified and, as a first step, the glomerular targets for this action should be characterized anatomically.

Previous investigations using ligand binding autoradiography for D2 dopamine receptors have demonstrated high levels of binding in the olfactory glomeruli (Wamsley *et al.*, 1989; Mansour *et al.*, 1990; Levey *et al.*, 1993; Coronas *et al.*, 1997) and it has been hypothesized that these receptors could be located presynaptically in the olfactory nerve (Nickell *et al.*, 1991). In agreement with this hypothesis, D2 receptor mRNA has been detected in the olfactory receptor neurons of the olfactory epithelium (Koster *et al.*, 1999) and electrophysiological

studies support a presynaptic action of D2 receptors in the terminals of the olfactory axons (Hsis *et al.*, 1999; Berkowicz & Trombley, 2000; Ennis *et al.*, 2001).

Although autoradiography allows the visualization of the bulbar layers where D2 receptors are present, and *in situ* hybridization demonstrates D2 receptor expression in the olfactory receptor neurons, these approaches do not provide enough resolution to determine the subcellular localization of this receptor within the glomerular neuropil. At present, there is no other anatomical evidence demonstrating that D2 receptors are presynaptically located in the glutamatergic synapses from the olfactory nerve to mitral/tufted cells and periglomerular cells. Moreover, the presence of D2 receptors in the other elements that integrate the glomerular circuitry (i.e. intraglomerular dendrites of mitral/tufted cells and periglomerular cells) has not been analysed.

There are anatomical data that locate the expression of D2 receptor mRNA in a population of periglomerular cells (Mansour *et al.*, 1990). Other data from *in vitro* experiments indicate the expression of D2 receptors in cultured mitral cells and suggest that this receptor can modulate the excitatory neurotransmission between mitral cells and interneurons (Davila *et al.*, 2003). Altogether, these previous data led us to analyse the subcellular distribution of D2 receptors in the elements of the glomerular circuits. For that, we have used pre-embedding immunogold-silver labelling and electron microscopy. The present results give support for a presynaptic action of D2 receptors in different elements of the glomerular circuitry, suggesting a complex role for dopamine in the processing of the olfactory information.

Correspondence: Dr Carlos Crespo, as above.
E-mail: Carlos.Crespo@uv.es

Received 10 May 2005, revised 5 July 2005, accepted 11 July 2005

doi:10.1111/j.1469-9568.2005.04328.x

Materials and methods

Fixation

Eight adult female Wistar rats were used for this study. Animals were deeply anaesthetized with 4% chloral hydrate in physiological saline (1 mL/100 g body weight) and intra-aortically perfused, first with saline for 1 min, followed by 50 mL of 3.8% acrolein (Fluka AG, Switzerland) and 2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB) and then by 450 mL of 2% paraformaldehyde in PB. All the procedures were in accordance with the guidelines of the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and Spanish legislation for the use and care of animals.

After perfusion, the brains were removed and the OBs were dissected out. The OBs were cut with a vibratome (Leica VT 1000E, Leica, Nussloch, Germany) and 60- μ m-thick transverse sections were collected and kept in cold PB (4 °C) before processing. For immunocytochemistry, free floating sections were treated with 1% NaBH₄ for 20 min, rinsed 3 \times 10 min in PB, cryoprotected overnight by immersion in a mixture of 25% sucrose and 10% glycerol in 0.05 M PB at 4 °C and then freeze-thawed three times in liquid nitrogen to enhanced antibody penetration.

D2 receptor immunocytochemistry for light microscopy

For this protocol, we have used the avidin-biotin-peroxidase (ABC) method. Sections were carefully washed in PB and sequentially incubated in: (i) blocking solution, containing 2% bovine serum albumin (BSA) and 10% normal goat serum (NGS) in PB for 45 min; (ii) polyclonal rabbit antiD2 receptor serum (Chemicon, Temecula, CA; 1 : 200 in PB containing 2% BSA and 1% NGS) for 36 h; (iii) biotinylated goat antirabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, 1 : 200 in PB) for 2 h and (iv) avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vector, 1 : 200 in PB) for 2 h. The peroxidase reaction was developed using 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma, St. Louis, MO) as chromogen and 0.003% hydrogen peroxide in PB. After each step, sections were carefully rinsed in PB (3 \times 5 min). Immunolabelling was intensified treating the sections with 2% osmium tetroxide (EMS, Hatfield, PA) for 90 min at room temperature. Finally, sections were dehydrated through increasing graded ethanol series, rinsed with propylene oxide and flat-embedded in Durcupan (Fluka).

Pre-embedding immunogold-silver detection of D2 dopamine receptor for electron microscopy

The analysis of the D2 receptor immunostaining under the light microscope does not provide enough resolution to identify the elements of the glomerular neuropil that express the receptor. To identify these elements, we have performed pre-embedding immunogold-silver detection of D2 receptor analysing the material under the electron microscope. In this procedure, sections were washed in 0.1 M phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) and sequentially incubated in: (i) blocking solution, containing 0.8% BSA and 0.1% gelatine in PBS for 45 min; (ii) polyclonal rabbit antiD2 receptor serum (1 : 200 in blocking solution) for 48 h at 4 °C; (iii) 1 nm colloidal gold-labelled goat antirabbit IgG (Amersham, Arlington Heights, IL; 1 : 100 in blocking solution) for 2 h at room temperature followed for 24 h at 4 °C; (iv) blocking solution (3 \times 5 min) and finally (v) 2% glutaraldehyde in PBS for 10 min to fix gold particles. After each step, sections were rinsed (3 \times 10 min) in PBS. For the microscopic analysis of the staining, the gold particles were enlarged using silver

enhancer IntenSE™ M kit (Amersham) for 7 min at 25 °C. The enhancement was stopped in 0.03 M sodium thiosulphate in an enhancement conditioning solution (Aurion, Wageningen, The Netherlands) for 10 min. Afterwards, the sections were washed in PBS and then lipids were postfixated with 2% osmium tetroxide (EMS) for 60 min at room temperature. Then, the sections were stained with 2% uranyl acetate (Sigma) in ethanol 70% for 75 min, dehydrated through increasing graded ethanol series, cleared in propylene oxide and flat-embedded in Durcupan (Fluka). After analysis of the sections under the light microscope, some sections containing olfactory glomeruli were re-embedded and 60-nm-thick ultrathin sections were cut with an ultramicrotome. Ultrathin sections were serially collected on single-slot Formvar-coated nickel grids and stained using lead citrate.

Double pre-embedding detection of D2 receptor and tyrosine hydroxylase

To test the possibility of localization of D2 receptor as an autoreceptor in the gemmules of the dopaminergic periglomerular cells, pre-embedding immunogold-silver detection for D2 receptor was combined with pre-embedding immunocytochemistry for tyrosine hydroxylase (TH) using the avidin-biotin-peroxidase (ABC) method. For this experiment, sections were sequentially incubated in: (i) blocking solution, for 45 min; (ii) a mixture of monoclonal mouse TH antibody (Chemicon; 1 : 300 in the final mixture) and polyclonal rabbit antiD2 receptor serum (1 : 200 in the final mixture) for 36 h at 4 °C; (iii) a mixture of biotinylated goat antimouse IgG (Vector; 1 : 200 in the final mixture) and 1 nm colloidal gold-labelled goat antirabbit IgG (Amersham; 1 : 100 in the final mixture) for 2 h at room temperature followed by 24 h at 4 °C; primary and secondary antibodies were diluted in blocking solution; (iv) blocking solution (3 \times 5 min); (v) 2% glutaraldehyde in PBS for 10 min; (vi) silver enhancer IntenSE™ M kit (Amersham) for 7 min; (vii) 0.03 M sodium thiosulphate in the enhancement conditioning solution (Aurion) for 10 min; (viii) avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (1 : 200 in PB) for 2 h at room temperature and (ix) 0.05% DAB (Sigma) and 0.003% hydrogen peroxide in PB for 30 min. After each step, sections were rinsed in PB (3 \times 5 min). After immunocytochemistry, sections were postfixated in 2% osmium tetroxide (EMS) in PB for 60 min at room temperature. Finally, sections were stained with 2% uranyl acetate (Sigma) in 70% ethanol for 75 min, dehydrated through increasing graded ethanol series, cleared in propylene oxide and flat-embedded in Durcupan. After the analysis of the sections under the light microscope, some dopaminergic periglomerular cells, easily identifiable by the DAB precipitate, were re-embedded in Durcupan, and 60-nm-thick ultrathin sections were cut with an ultramicrotome. Ultrathin sections were serially collected on single-slot Formvar-coated nickel grids and stained using lead citrate. Under the electron microscope, TH-immunopositive profiles were identified in the glomerular neuropil and the presence of gold-silver particles in these elements was analysed.

Post-embedding immunogold staining for GABA

To analyse the GABAergic nature of some of the D2 receptor-containing elements of the glomerular neuropil, pre-embedding immunogold detection for D2 receptor was combined with post-embedding immunogold detection for GABA. Post-embedding immunostaining for GABA was carried out according to Semogyi & Hodgson (1985), with slight variations as previously reported (Crespo *et al.*, 2000). All steps were carried out on droplets of solution in

humid Petri dishes as follows: 0.5% periodic acid (H_2IO_6) for 5 min; blocking solution containing 1% chicken egg albumin in 0.05 M Tris-HCl buffer saline, pH 7.4 (TBS), for 30 min; rabbit antiGABA serum (Sigma; 1 : 2500 in 1% NGS in TBS) for 2 h; 1% BSA and 0.05% Tween 20 in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 (TB), for 10 min; goat anti-rabbit IgG-coated colloidal gold (Sigma, #G7402, 10 nm, 1 : 15 in TB containing 1% BSA and 0.05% Tween 20) for 2 h; 2% glutaraldehyde in PBS for 2 min; saturated uranyl acetate for 45 min; and finally stained with lead citrate.

Profiles showing a density of colloidal gold particles threefold higher than background in three adjacent sections were considered GABA-immunoreactive. Profiles of olfactory nerve terminals and mitral/tufted cells (presumed to be glutamatergic elements) were used to establish background density.

Antibodies

For the detection of D2 dopamine receptors, a commercial polyclonal antiserum raised in rabbit has been used (Chemicon, #AB5084P). This antiserum was raised against a 28 amino acid peptide sequence from the human D2 dopamine receptor in the third cytoplasmic loop. It recognizes the two forms of D2 dopamine receptors encoded by splice variants of a unique gene (the short and long forms). The antiserum used in the study does not detect other dopamine receptors such as the D1 and D3–D5, being specific for D2 receptors, because the immunogen peptide does not show significant homology with those dopamine receptors. The company of origin tested the specificity for the antiserum. Moreover, its specificity in rat tissue has been previously tested and confirmed by the absence of immunoreactivity in controls of preimmune antiserum and immunogen peptide adsorption (Boundy *et al.*, 1993). Finally, the specificity for rat D2 dopamine receptors has been confirmed by immunoblotting and immunocytochemistry (Zhou *et al.*, 2001; Wang & Pickel, 2002). Additional controls for the immunocytochemical procedure were carried out in our laboratory by omitting the first or second antibodies in each step

and by incubating some sections exclusively in the blocking solution or in the silver enhancer solution.

Dopaminergic periglomerular cells were labeled using a commercial monoclonal antibody (Chemicon, #MAB318) against TH purified from PC12 cells. The company of origin tested its specificity in rat tissue. Moreover, the specificity of the antibody has been confirmed by immunocytochemistry (Berhow *et al.*, 1996; Betarbet *et al.*, 1997). Additional controls for the procedure were performed in our laboratory as described for the D2 receptor polyclonal antibody.

For the detection of GABA, a commercial polyclonal antiserum raised in rabbit has been used (Sigma, #A2052). This antibody has been developed using GABA-BSA as the immunogen. The company of origin tested its specificity: the antibody shows positive binding for GABA in a dot blot assay and negative binding for BSA. This antiserum has been previously used in post-embedding immunogold detection of GABA (Crespo *et al.*, 2000). Controls for the immunocytochemical procedure were carried out as previously described (Crespo *et al.*, 2000).

Results

After D2 dopamine receptor immunocytochemistry, specific staining was observed under the light microscope in the glomerular neuropil. The staining was homogeneous throughout the whole population of olfactory glomeruli and all of them (those located in the dorsal, ventral, lateral and medial portions of the glomerular layer) were equally stained. This staining corresponded to puncta in the glomerular neuropil, but the origin of these puncta could not be identified under light microscopy in the sections stained using the avidin-biotin-peroxidase method (Fig. 1). The somata of the principal cells (mitral and tufted cells) and those of the interneurons (periglomerular cells and superficial short-axon cells in the periglomerular region of the glomerular layer, interneurons of the external plexiform layer, and granule cells and deep short-axon cells in the infraglomerular layers) were D2 receptor-immunonegative.

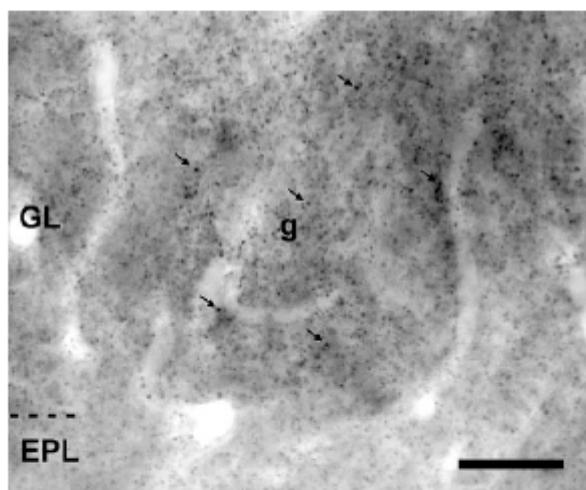


FIG. 1. D2 receptor immunocytochemistry shows an abundant immunostaining (arrows) in the glomerular neuropil (g), although the immunopositive elements cannot be identified at the light microscope. EPL, external plexiform layer; GL, glomerular layer. Scale bar, 50 μ m.

1360 M. Gutiérrez-Mecinas *et al.*

To identify the elements of the glomerular neuropil that express D2 dopamine receptor, a pre-embedding immunogold-silver labelling was carried out and the results were analysed under the electron microscope. The D2 dopamine receptor appeared in both the synaptic and the sensory subcompartments of the glomerular neuropil and it was found in three elements of the glomerular circuitry: (i) olfactory axons; (ii) dendritic portions of principal cells and (iii) gemmules of a subpopulation of periglomerular cells.

In the olfactory axons, D2 receptor was clearly associated to the plasma membrane of the terminals (92% of the gold-silver particles were found linked to the plasma membrane of the olfactory axon terminals; $n = 100$ gold-silver particles) (Fig. 2A and B). Frequently, gold-silver particles appeared clearly linked to the presynaptic specialization of the asymmetrical synaptic contacts established from

the olfactory axon terminals on dendritic profiles of mitral/tufted cells or on dendritic gemmules of periglomerular cells (Fig. 2C–H). Sometimes, the gold-silver particles were not located in the synaptic specializations, but in close proximity to them, showing a 'perisynaptic' distribution.

In the mitral/tufted cells, D2 receptor was located in the dendritic trunks of the synaptic and sensory subcompartments of the glomerular neuropil. The gold-silver particles appeared bound to the plasma membrane of the dendrite (55% of the gold-silver particles; $n = 100$) or were found in the dendritic cytoplasm (45% of the gold-silver particles; $n = 100$) without clear association to any dendritic organelles (Fig. 3). When D2 receptors appeared associated to the plasma membrane of the dendrites of the mitral/tufted cells, the gold-silver particles were frequently found in the presynaptic specialization of the

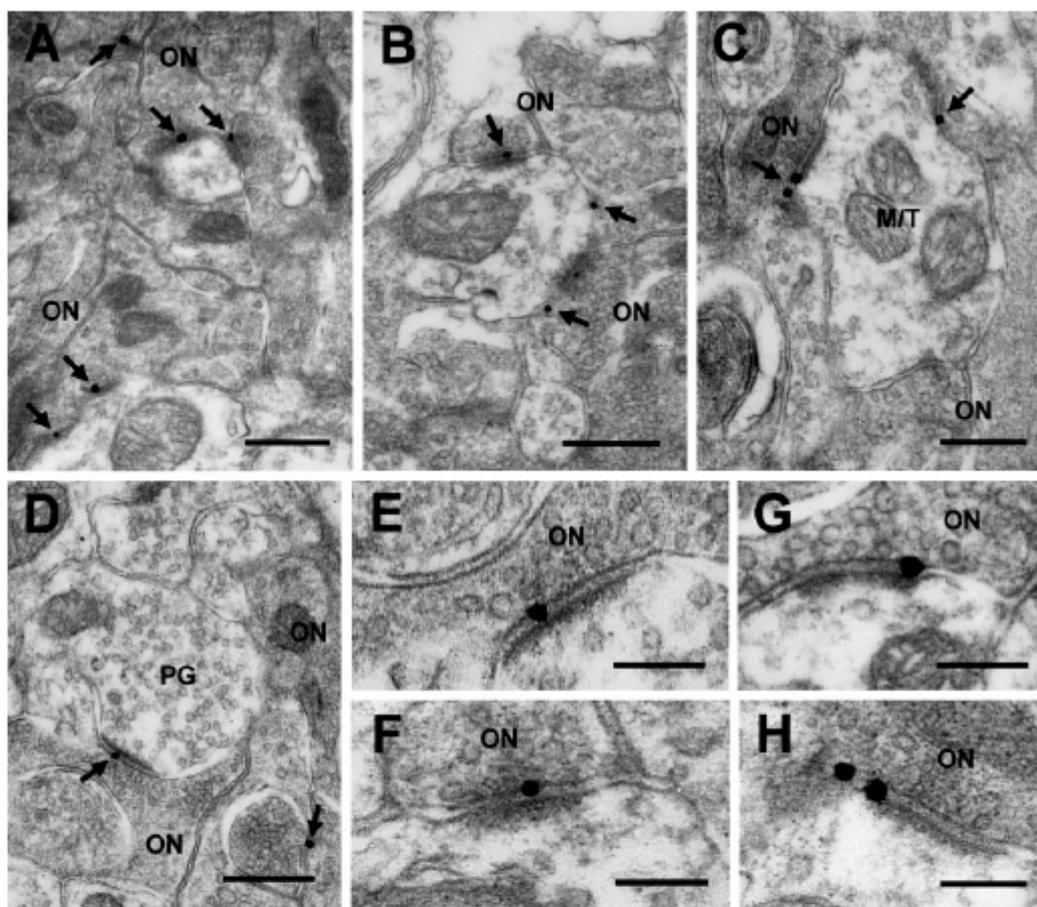


FIG. 2. D2 receptor in the terminals of the olfactory axons. (A and B) The receptor abounds in the sensory subcompartment of the glomerular neuropil. Gold-silver particles (arrows) appear linked to the plasma membrane of the terminals of the olfactory nerve (ON). (C and D) The receptor (arrows) located in the terminals of the olfactory nerve (ON) is frequently associated to the asymmetrical synaptic contacts that the nerve makes upon the dendrites of mitral and tufted cells (M/T) (C) or upon the gemmules of periglomerular cells (PG) (D). (E–H) High magnification micrographs showing that the gold-silver particles are linked to the presynaptic membrane of the asymmetrical contacts from the olfactory nerve (ON). The contacts shown in E, F and H correspond to the contacts marked in D, B and C, respectively. Scale bars: 400 nm (A–D) 150 nm (E–H).

© 2005 Federation of European Neuroscience Societies, *European Journal of Neuroscience*, 22, 1357–1367

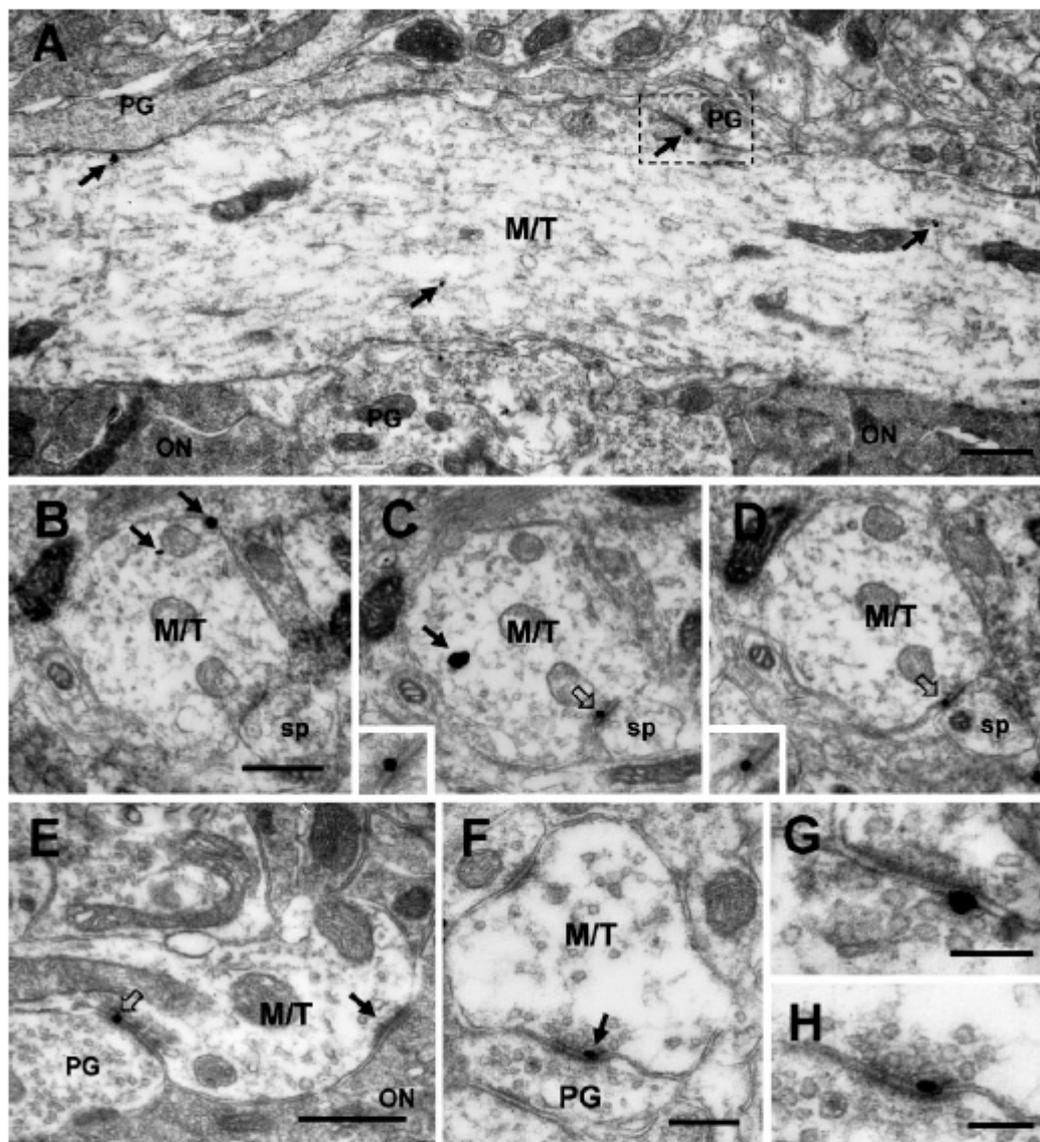


FIG. 3. D2 receptor in the intraglomerular dendrites of the mitral/tufted cells. (A) Longitudinal section of a large dendritic branch of a mitral/tufted cell (M/T) showing D2 receptor immunolabelling (arrows). The squared area shows a gold-silver particle linked to the postsynaptic membrane of an asymmetrical synaptic contact from the M/T upon the gemmule of a periglomerular cell (PG). This area is magnified in (G). ON marks profiles of the olfactory nerve. (B–D) Dendritic profile of a mitral/tufted cell (M/T) showing D2-immunoreactivity in three adjacent ultrathin sections (arrows). Note in (C) and (D) that some gold-silver particles (open arrows) are located presynaptically in the asymmetrical synaptic contact from the M/T upon the spine (sp.) of a putative periglomerular cell. This contact is magnified in the insets. (E) A mitral/tufted cell (M/T) receives a synapse (arrow) from the olfactory nerve (ON) and, in turn, makes a synapse (open arrow) upon the gemmule of a periglomerular cell (PG). In this contact, D2 receptor appears in the M/T linked to the presynaptic specialization. (F) Presynaptic localization of D2 receptor (arrow) in an asymmetrical synaptic contact from a mitral/tufted cell (M/T) upon a periglomerular cell (PG). (G and H) High magnification of the synaptic contacts shown in (A) and (F), respectively. Note that the gold-silver particles are linked to the presynaptic membrane. Scale bars, 500 nm (A–E); 250 nm (F); 150 nm (G and H).

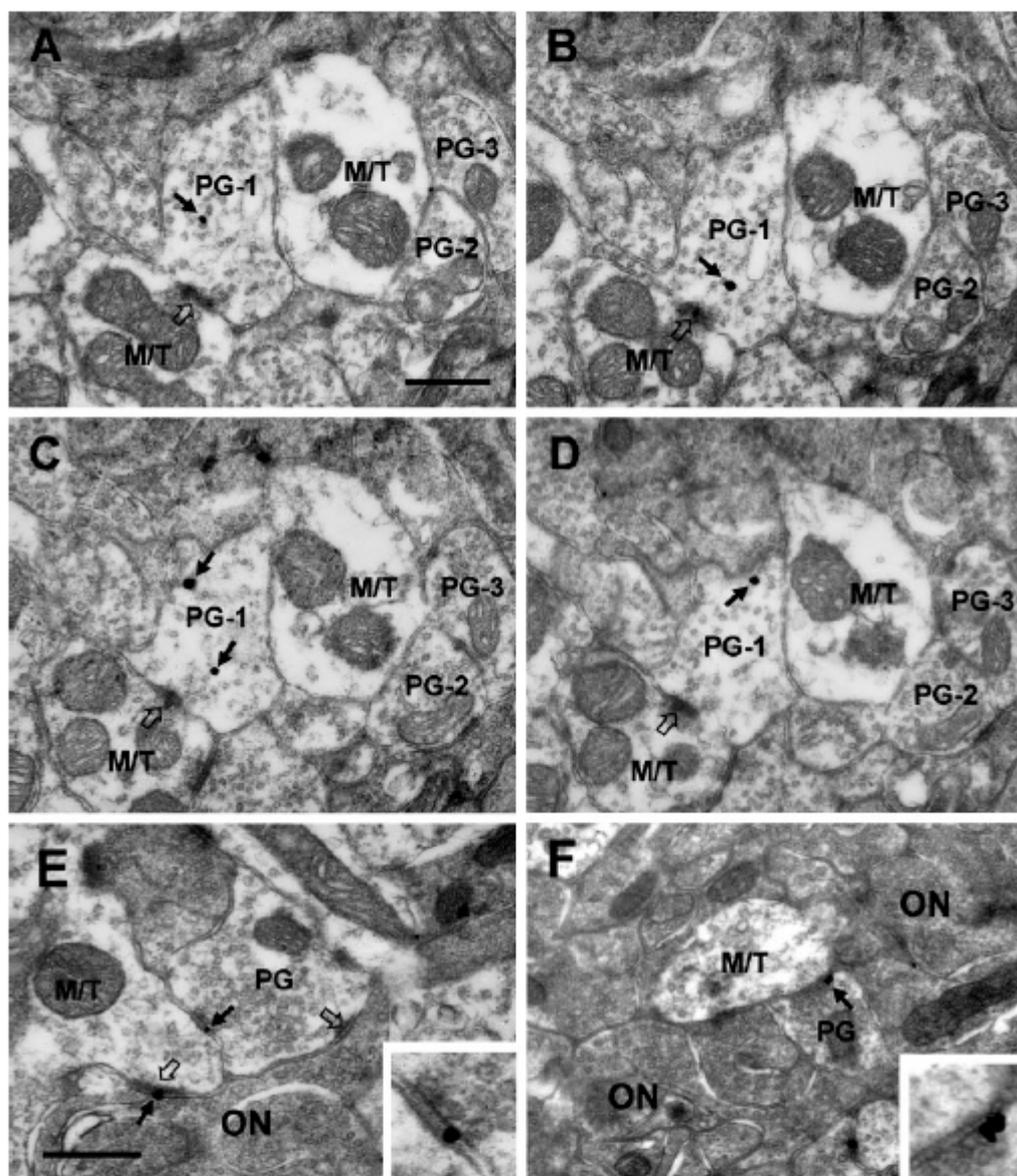


FIG. 4. D2 receptor in the intraglomerular dendrites of periglomerular cells. (A–D) The gemmule of a periglomerular cell (PG-1) that contains D2 receptors (arrows) is shown in four adjacent ultrathin sections. In its proximity, two gemmules of periglomerular cells (PG-2 and PG-3) do not contain gold-silver particles. Open arrows indicate a synapse from a mitral/tufted cell (M/T) upon PG-1. (E) Triadic synaptic contacts in the sensory subcompartment of the glomerular neuropil. The olfactory nerve (ON) makes synapses on a dendritic profile of a mitral/tufted cell (M/T) and upon a gemmule of a periglomerular cell (PG), respectively (open arrows). In turn, the PG makes a symmetrical synapse upon the M/T. Note that D2 receptor is located presynaptically in the asymmetrical synaptic contact from the ON to the M/T and in the symmetrical synaptic contact from the PG to the M/T (arrows). The symmetrical synapse is magnified in the inset. (F) D2 receptor (arrow) appears presynaptically located in a symmetrical synaptic contact from the gemmule of a periglomerular cell (PG) to a dendritic profile of a mitral/tufted cell (M/T). This contact is magnified in the inset. Scale bars, 400 nm.

asymmetrical synapses that the mitral/tufted cells made upon the spines or the gemmules of the periglomerular cells (Fig. 3C-H), or in close proximity to them, showing a 'perisynaptic' distribution. On the contrary, in the mitral/tufted cells, no gold-silver particle was found either in the postsynaptic membrane of the asymmetrical synapses that the mitral/tufted cells receive from the olfactory axons, or in the postsynaptic membrane of the symmetrical synaptic contacts that the mitral/tufted cells receive from the periglomerular cells.

D2 receptors also appeared in dendritic profiles that do not correspond to mitral/tufted cells. These profiles were identified as

periglomerular cells using the synaptology as criterion. Periglomerular cells are clearly identifiable at the ultrastructural level because: (i) they receive dendrodendritic asymmetrical synaptic contacts from mitral/tufted cells; (ii) they make dendrodendritic symmetrical synaptic contacts on mitral/tufted cells (Pinching & Powell, 1971). We have found D2 receptor immunostaining in some dendritic profiles, which received asymmetrical synapses from mitral/tufted cells and made symmetrical synapses upon dendrites of mitral/tufted cells. This synaptology unequivocally indicated that these D2 receptor immunopositive profiles belong to periglomerular cells. In most of

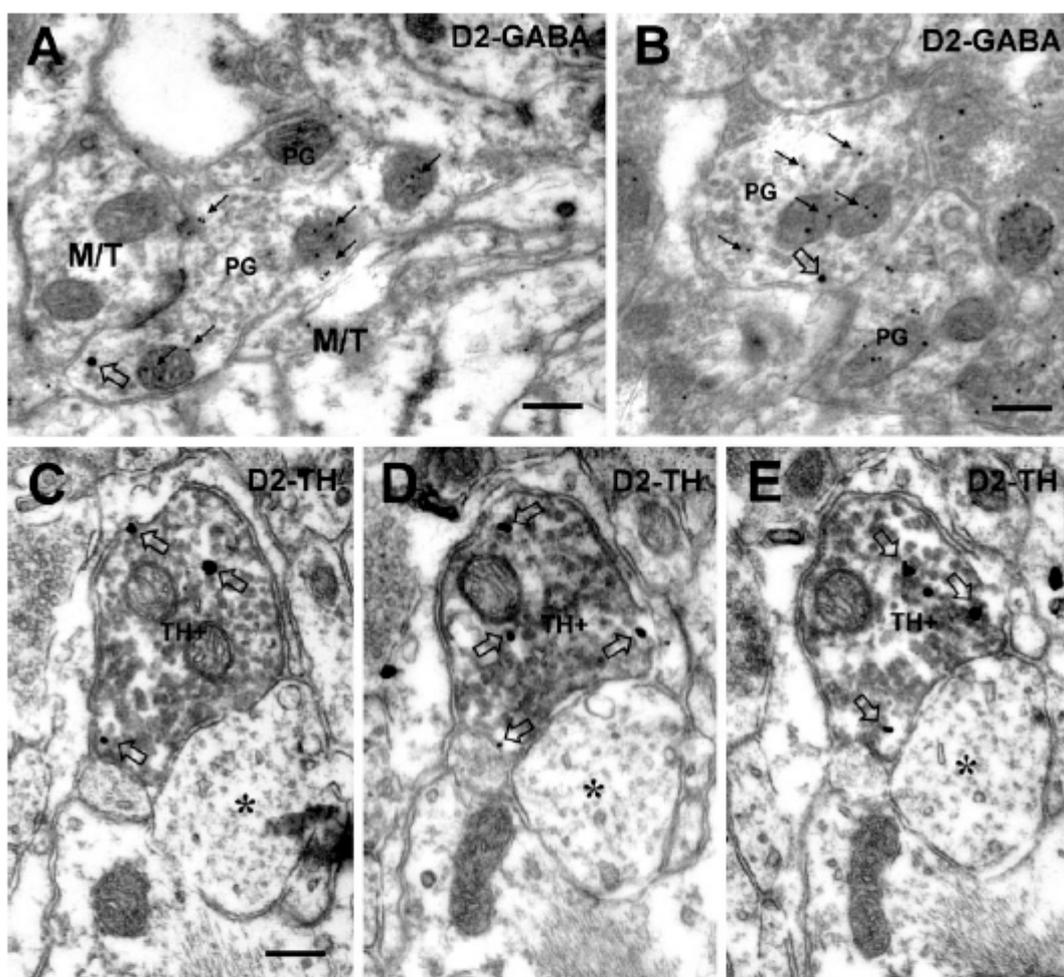


FIG. 5. The periglomerular cells that contain D2 receptor are GABAergic and dopaminergic. (A and B) Pre-embedding immunogold detection of D2 receptor (large gold-silver particles; open arrows) and post-embedding immunogold detection of GABA (small gold particles; arrows) demonstrates that the periglomerular cells (PG) that express D2 receptors are GABAergic. The dendritic profiles of the mitral/tufted cells (M/T) were used to establish the background density of the immunocytochemistry. Labelling for GABA in the mitochondria of the immunopositive elements is a common phenomenon in this method, due to the fixation of this neurotransmitter on the membranes of the mitochondria. (C-E) Double pre-embedding detection of D2 receptor (gold-silver particles; open arrows) and tyrosine hydroxylase (TH+ electron-dense DAB precipitate) demonstrates that D2 receptor appears as autoreceptor in the gemmules of the dopaminergic (TH-immunopositive) periglomerular cells. Asterisk points to a dendritic profile that does not contain TH nor D2 receptor. Scale bars, 250 nm.

these periglomerular cells, the gold-silver particles were not found associated to the plasma membrane (72% of the gold-silver particles; $n = 100$; Fig. 4A–D), although in some cases the particles were linked to the presynaptic membrane (28% of the gold-silver particles; $n = 100$) of the symmetrical synapses that these interneurons made on the mitral/tufted cells (Fig. 4E and F). In periglomerular cells, the receptor was never found in a postsynaptic location in the asymmetrical synapses that these interneurons receive from the olfactory nerve or from the mitral/tufted cells.

By observing serial ultrathin sections, we have found that the receptor seems to be located only in a subset of periglomerular cells (Fig. 4A–D). It has been demonstrated that periglomerular cells constitute a heterogeneous group, and two different types of these interneurons have been identified on basis of their connectivity and neurochemical properties (Kosaka *et al.*, 1998). Type 1 periglomerular cells receive synapses from the olfactory nerve and are GABA-immunoreactive, whereas type 2 periglomerular cells do not receive sensory input from the olfactory axons and are not GABA-immunoreactive. Some of the periglomerular cells containing D2 receptor were found receiving synapses from the olfactory axons (Fig. 4E). This finding suggested that at least some of the D2 receptor-containing periglomerular cells belong to the type 1 periglomerular cells. To corroborate this fact, we have tested the immunoreactivity for GABA of the D2 receptor-immunopositive periglomerular cells, combining pre-embedding immunogold-silver detection of D2 receptor with post-embedding immunogold-silver detection for GABA. This experiment demonstrated that at least some of the periglomerular cells that expressed D2 receptor were GABAergic (Fig. 5A and B) and therefore belonged to the type 1. In the rat OB, type 1 periglomerular cells include the population of dopaminergic periglomerular cells (Toida *et al.*, 2000), and therefore it was interesting to investigate whether these dopaminergic periglomerular cells expressed D2 receptor or not. For this reason, we carried out a pre-embedding double-immunocytochemistry for the detection of D2 receptor, using the gold-silver method, and TH, using DAB as chromogen. In this experiment, we found D2 receptor in the gemmules of TH-immunopositive periglomerular cells (Fig. 5C–E).

Discussion

This study provides the first subcellular localization of D2 dopamine receptors in elements of the neuropil of the olfactory glomeruli. The circuitry of the glomerular neuropil is composed of four different elements (Pinching & Powell, 1971). The first corresponds to the terminals of the olfactory axons that establish asymmetrical synaptic contacts upon dendritic profiles of the mitral/tufted cells and periglomerular cells. The second corresponds to the dendritic tufts of the mitral/tufted cells. The dendritic branches of the periglomerular cells integrate the third element of the glomerular neuropil. The dendrites of the periglomerular cells and mitral/tufted cells establish dendrodendritic synaptic contacts that include asymmetrical contacts from the mitral/tufted cell to the periglomerular cell and symmetrical synapses from the periglomerular cell to the mitral/tufted cell, sometimes establishing reciprocal pairs. Finally, axons of centrifugal origin integrate the fourth element of the glomerular circuitry.

The D2 receptor immunopositive elements that we have found include terminals of the olfactory axons, intraglomerular dendrites of the mitral/tufted cells and gemmules of a subset of periglomerular cells that are both, GABAergic and dopaminergic. Noteworthy, is that D2 receptors are mainly distributed in a presynaptic location in the

elements of the neuropil. Our results give support to previous electrophysiological studies describing that dopamine modulates the glutamate release from the olfactory axons to the dendrites of mitral/tufted cells and periglomerular cells. Moreover, we provide evidence indicating that dopamine could modulate through D2 receptors: (i) glutamate release from mitral/tufted cells to periglomerular cells and (ii) GABA and/or dopamine release from periglomerular cells to mitral/tufted cells.

D2 dopamine receptor in the terminals of the olfactory axons

Pioneering studies demonstrated high levels of binding for selective D2 receptor ligands in the glomerular layer and olfactory nerve layer of the rat OB (Palacios *et al.*, 1981; Charuchinda *et al.*, 1987; Van der Weide *et al.*, 1987; Clossé *et al.*, 1988; Wamsley *et al.*, 1989; Guthrie *et al.*, 1991; Nickell *et al.*, 1991). From these results, it was hypothesized that D2 receptors might be present in the terminals of the olfactory axons. More recently, Koster *et al.* (1999) have corroborated this hypothesis demonstrating the presence of D2 receptor mRNA in mature olfactory receptor neurons. From a functional point of view, electrophysiological data indicated that dopamine depresses synaptic inputs into the OB via activation of presynaptic D2 receptors that should be located in the terminals of the olfactory axons (Berkowicz & Trombley, 2000; Hsia *et al.*, 1999; Ernis *et al.*, 2001). Nevertheless, none of these previous studies has provided a direct visualization of the subcellular location of the dopamine receptor in the terminals of the olfactory nerve. Our results demonstrate that D2 receptors show a precise distribution in these terminals. They are frequently associated to the presynaptic specialization of the asymmetrical synaptic contacts from the olfactory nerve, giving support to the presynaptic function proposed for these receptors by electrophysiology. It is interesting to notice that D2 receptors appear linked to the synaptic contacts from the olfactory nerve on both, mitral/tufted cells (principal cells) and periglomerular cells (inhibitory interneurons), which, in turn, contact with the mitral/tufted cells (Fig. 6A). Taking into account the glomerular circuitry, the reduction of olfactory input could induce in the periglomerular cells a decrease of the GABAergic transmission from their gemmules upon the intraglomerular dendrites of the mitral/tufted cells. This may indicate that the direct reduction of the entrance of sensory information to the mitral/tufted cells could be simultaneously accompanied by a disinhibition of the mitral/tufted cells (Fig. 6A).

D2 dopamine receptor in mitral/tufted cells

One of the most striking findings in our study is the unequivocal presence of D2 receptors in the intraglomerular dendrites of mitral/tufted cells. The expression of D2 receptors has been recently reported in cultured mitral cells from rat OB (Davila *et al.*, 2003). Nevertheless, previous reports have failed to demonstrate the presence of these receptors in the mitral/tufted cells of the rat OB *in vivo*. In this regard, D2 receptors have not been detected in mitral and tufted cells using autoradiography (Nickell *et al.*, 1991; Koster *et al.*, 1999), although it is well known that the resolution achieved using this technique is insufficient to discard the expression of the receptor in those cells. In addition, D2 receptor mRNA has not been detected in mitral/tufted cells using *in situ* hybridization (Mengod *et al.*, 1989; Mansour *et al.*, 1990; Cormas *et al.*, 1997). However, *in situ* hybridization sometimes does not provide enough hybridization signal to be detected in the tissue, and it could be the case that while a protein is present, its corresponding mRNA may not be detectable. In contrast,

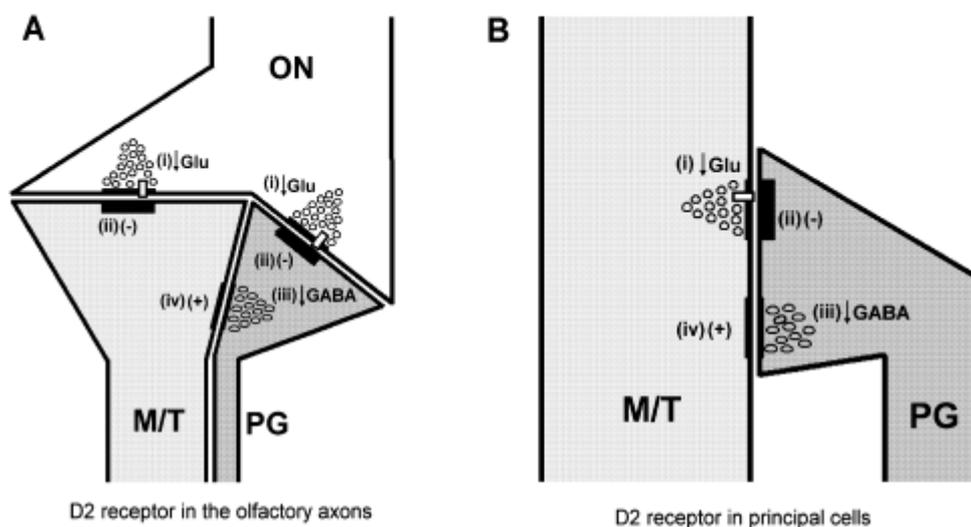


FIG. 6. Possible effects of dopamine mediated by activation of D2 receptors present in the olfactory axons and in mitral/tufted cells. (A) Presynaptic localization of D2 receptor in the olfactory nerve (ON). (i) Activation of D2 receptors linked to the presynaptic specialization of the asymmetrical synapses that the ON makes upon mitral/tufted cells (M/T) and periglomerular cells (PG) could decrease the release of glutamate (Glu) from the nerve. (ii) This effect could lead to a reduction of the ON-evoked synaptic responses in M/T and in PG (-). (iii) In turn, this reduction could provoke in the PG a decrease of the GABAergic transmission (GABA) upon the M/T. (iv) Finally, this effect could lead to a disinhibition (+) of the M/T. (B) Presynaptic localization of D2 receptor in the mitral/tufted cells (M/T). (i) Activation of D2 receptors linked to the presynaptic specialization of the asymmetrical synapses of the M/T on PG could decrease the release of glutamate (Glu) from these synapses. (ii) The decrease could lead to a reduction of the M/T-evoked synaptic response in the PG (-). (iii) This reduction could provoke the decrease of the GABAergic transmission (GABA) from the PG upon the M/T. (iv) Finally, this effect could lead to a disinhibition (+) of the M/T.

the pre-embedding immunogold-silver method used in our study is sensitive enough to detect unequivocally the presence of D2 receptors in the intraglomerular dendrites of the mitral/tufted cells of the rat OB. Moreover, it shows the precise subcellular localization of the receptor within the dendrites, demonstrating that, frequently, it appears linked to the presynaptic specialization of the asymmetrical synaptic contacts from the mitral/tufted cells upon the periglomerular cells. This distribution seems to indicate that the activation of D2 receptors plays a functional role in the rat mitral and tufted cells, probably modulating presynaptically their excitatory synapses upon the periglomerular cells. This idea has been previously investigated in the mouse OB using electrophysiology (Ennis *et al.*, 2001). Nevertheless, these authors reported that dopamine did not significantly alter the mitral and tufted cell-evoked synaptic responses in juxtglomerular cells. Contrary to the data by Ennis *et al.* (2001), Davila *et al.* (2003) have shown, using cultures from rat OB neurons, that dopamine and the D2 receptor agonist bromocriptine modulate calcium channels and therefore the excitatory transmission between mitral/tufted cells and interneurons. Our results (see Fig. 3) support the data reported *in vitro* by Davila *et al.* (2003), and provide the anatomical basis for a presynaptic modulation of the synaptic transmission between mitral/tufted cells and periglomerular cells mediated by dopamine, via activation of D2 receptors. This idea, also agrees with previous reports describing the presence of D2 receptors in the mitral/tufted cells of the frog OB using D2 radioligand binding (Duchamp-Viret *et al.*, 1997) and immunocytochemistry (Davison *et al.*, 2004). In the frog, electrophysiological data indicate that activation of D2 receptors present in the mitral cells induces a drastic reduction of the spontaneous firing rate of mitral cells (Duchamp-Viret *et al.*, 1997) and inhibits synapses from the mitral and tufted cells on interneurons

(Davison *et al.*, 2004). The presynaptic location of D2 receptors in the asymmetrical synaptic contacts from the rat mitral/tufted cells on periglomerular cells supports a similar action in the rat, at least at glomerular level. If the presynaptic effect is the inhibition of the excitatory transmission from mitral/tufted cells upon interneurons, as Davila *et al.* (2003) demonstrate *in vitro* in the rat and Davison *et al.* (2004) report in the frog, this fact should lead to a decrease in the excitatory status of the postsynaptic periglomerular cells. In turn, the decrease of the excitatory status of the periglomerular cells, could lead to a decrease of their inhibitory actions upon the mitral and tufted cells, taking into account the glomerular circuitry (Fig. 6B).

In addition to this functional argumentation, we cannot exclude alternative roles for dopamine in the intraglomerular dendrites of the mitral and tufted cells. Brünig *et al.* (1999) demonstrated that dopamine and the D2 receptor agonist bromocriptine could modulate GABA_A receptors, facilitating GABA responses in cultured mitral and tufted cells from rat OB. A similar effect of dopamine and D2 receptors cannot be discarded in the intraglomerular dendrites of the mitral and tufted cells *in vivo*, taking into account that GABA_A receptors are present in the mitral/tufted cells of the rat OB (Giustetto *et al.*, 1998; Panzanelli *et al.*, 2004). If the activation of D2 receptors modulates GABA_A receptors of the mitral/tufted cells facilitating the GABAergic transmission from periglomerular cells, this fact should lead to an increase in the inhibition of the mitral/tufted cells.

D2 dopamine receptor in periglomerular cells

Another striking result found in our report is the presence of D2 receptor in dendrites that do not correspond to profiles of mitral/tufted

cells. These dendrites have been identified as dendrites of periglomerular cells using the unequivocal criterion of the synaptology (Pinching & Powell, 1971). This finding is in close agreement with the expression of D2 mRNA in a subpopulation of periglomerular cells of the rat OB that has been detected by Mansour *et al.* (1990). Analyses of serial ultrathin sections seem to indicate that D2 receptors do not appear in the whole population of periglomerular cells. They appear in a subset that receives synapses from the olfactory nerve, contains GABA and TH, and therefore corresponds to the dopaminergic periglomerular cells of the type 1 previously described (Kosaka *et al.*, 1998; Toida *et al.*, 2000). The presence of D2 receptor in dopaminergic periglomerular cells could indicate a presynaptic function of the receptor, modulating the release of dopamine from the gemmules of these cells. A similar action of D2 receptors, as autoreceptors, has been widely demonstrated in dopaminergic fibers in several brain regions (Bjelke *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1999; Adell & Arriaga, 2004).

In the terminals of the olfactory axons and in the dendrites of the mitral/tufted cells, D2 receptors appear in most of the cases linked to the plasma membrane. Nevertheless, the subcellular localization of D2 receptors in the gemmules of the periglomerular cells indicates that, gold-silver particles were only occasionally found linked to the plasma membrane of the gemmule, whereas in most cases they were found in the cytoplasm of the gemmule. This fact probably indicates that most of the D2 receptors found in the dopaminergic gemmules are internalized. Internalization of D2 receptors could be induced by dopamine and indicates a low affinity state of the receptor as it has been previously reported (Ko *et al.*, 2002).

Acknowledgements

This study has been supported by the Spanish MCYT-FEDER: BFE001-3186; MEC, BFU2004-00931 and BFE003-01254; and by the Generalitat Valenciana, GV04A-076, GV04A-134 and Grupos 03/119.

Abbreviations

BSA, bovine serum albumin; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; NGS, normal goat serum; OB, olfactory bulb; PB, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4; PBS, 0.1 M phosphate buffered saline, pH 7.4; TB, 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4; TBS, 0.05 M Tris-HCl buffer saline, pH 7.4; TH, tyrosine hydroxylase.

References

- Adell, A. & Arriaga, F. (2004) The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **28**, 415-431.
- Berhow, M.T., Hiroi, N., Kobieráki, L.A., Hyman, S.E. & Nestler, E.J. (1996) Influence of cocaine on the JAK-STAT pathway in the mesolimbic dopamine system. *J. Neurosci.*, **16**, 8019-8026.
- Berkowicz, D.A. & Trombley, P.Q. (2000) Dopaminergic modulation at the olfactory nerve synapse. *Brain Res.*, **855**, 90-99.
- Betsholtz, R., Turner, R., Chocikian, V., DeLong, M.R., Allen, K.A., Walten, J., Levey, A.I. & Greenamyre, J.T. (1997) Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J. Neurosci.*, **17**, 6761-6768.
- Bjelke, B., Goldstein, M., Tinzer, B., Andersson, C., Sesack, S.R., Steinbusch, H.W., Lew, J.Y., He, X., Watson, S., Tengroth, B. & Fuxe, K. (1996) Dopaminergic transmission in the rat retina: evidence for volume transmission. *J. Chem. Neuroanat.*, **12**, 37-50.
- Bouandy, V.A., Luedtke, R.R., Armysyhyra, R.P., Filtz, T.M. & Molinoff, P.B. (1993) Development of polyclonal anti-D2 dopamine receptor antibodies using sequence-specific peptides. *Mol. Pharmacol.*, **43**, 666-676.
- Brüning, I., Sommer, M., Hart, H. & Bornmann, J. (1999) Dopamine receptor subtypes modulate olfactory bulb gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 2456-2460.

- Charuchinda, C., Supavilai, P., Kamboj, M. & Palacios, J.M. (1987) Dopamine D2 receptors in the rat brain: autoradiographic visualization using a high-affinity selective agonist ligand. *J. Neurosci.*, **7**, 1352-1360.
- Closse, A., Camps, M., Wimmer, A. & Palacios, J.M. (1988) *In vivo* labeling of brain dopamine D2 receptors using the high-affinity specific D2 agonist [³H]CV 205-502. *Brain Res.*, **440**, 123-132.
- Coronas, V., Srivastava, L.K., Liang, J.J., Joutan, F. & Moysé, E. (1997) Identification and localization of dopamine receptor subtypes in rat olfactory mucosa and bulb: a combined *in situ* hybridization and ligand binding radioautographic approach. *J. Chem. Neuroanat.*, **12**, 243-257.
- Caspe, C., Blasco-Blázquez, J.M., Britón, J.G., Alonso, J.R., Domínguez, M.I. & Martínez-Guajardo, F.J. (2000) Subcellular localization of m2 muscarinic receptors in GABAergic interneurons of the olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 3963-3974.
- Davila, N.G., Blakemore, L.J. & Trombley, P.Q. (2003) Dopamine modulates synaptic transmission between rat olfactory bulb neurons in culture. *J. Neurophysiol.*, **90**, 395-404.
- Davison, I.G., Boyd, J.D. & Delaney, K.R. (2004) Dopamine inhibits mitral/tufted-granule cell synapses in the frog olfactory bulb. *J. Neurosci.*, **24**, 8057-8067.
- Duchamp-Viret, P., Coronas, V., Delaleu, J.C., Moysé, E. & Duchamp, A. (1997) Dopaminergic modulation of mitral cell activity in the frog olfactory bulb: a combined radioligand binding-electrophysiological study. *Neuroscience*, **79**, 203-216.
- Ennis, M., Zhou, F.M., Ciombor, K.J., Aroniadou-Anderjaska, V., Hayat, A., Bocelli, E., Zimmer, L.A., Margolis, F. & Shipley, M.T. (2001) Dopamine D2 receptor-mediated presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals. *J. Neurophysiol.*, **86**, 2986-2997.
- Giustetto, M., Kim, J., Fritschy, J.M., Cantino, D. & Sasso-Pognetto, M. (1998) Localization of the clustering protein gephyrin at GABAergic synapses in the main olfactory bulb of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **395**, 231-244.
- Guzrie, K.M., Pullara, J.M., Marshall, J.F. & Leon, M. (1991) Olfactory deprivation increases dopamine D2 receptor density in the rat olfactory bulb. *Synapse*, **8**, 61-70.
- Hallaz, N., Johansson, O., Holcét, T., Ljungdahl, A. & Goldstein, M. (1981) Immunohistochemical identification of two types of dopamine neuron in the rat olfactory bulb as seen by serial sectioning. *J. Neurocytol.*, **10**, 251-259.
- Hsia, A.Y., Vincent, J.D. & Llado, P.M. (1999) Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb. *J. Neurophysiol.*, **82**, 1082-1085.
- Ko, F., Seeman, P., Sun, W.S. & Kapur, S. (2002) Dopamine D2 receptors internalize in their low-affinity state. *Neuroreport*, **13**, 1017-1020.
- Kosaka, K., Toida, K., Aika, Y. & Kosaka, T. (1998) How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci. Res.*, **30**, 101-110.
- Kotter, N.L., Norman, A.B., Richmond, N.M., Nickell, W.T., Puche, A.C., Pirley, S.K. & Shipley, M.T. (1999) Olfactory receptor neurons express D2 dopamine receptors. *J. Comp. Neurol.*, **411**, 666-673.
- Levey, A.I., Hersch, S.M., Rye, D.B., Sunahara, R.K., Niznik, H.B., Kitt, C.A., Price, D.L., Maggio, R., Brann, M.R. & Ciliax, B.J. (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 8861-8865.
- Mansour, A., Mendos-Woodruff, J.H., Bunzow, J.R., Civelli, O., Aik, H. & Watson, S.J. (1990) Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an *in situ* hybridization-receptor autoradiographic analysis. *J. Neurosci.*, **10**, 2587-2600.
- Mengod, G., Martínez-Mir, M.I., Vilain, M.T. & Palacios, J.M. (1989) Localization of the mRNA for the dopamine D2 receptor in the rat brain by *in situ* hybridization histochemistry. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 8560-8564.
- Nickell, W.T., Norman, A.B., Wyatt, L.M. & Shipley, M.T. (1991) Olfactory bulb DA receptors may be located on terminals of the olfactory nerve. *Neuroreport*, **2**, 9-12.
- Palacios, J.M., Niehoff, D.L. & Kuhar, M.J. (1981) [³H]Spiperone binding sites in brain: autoradiographic localization of multiple receptors. *Brain Res.*, **213**, 277-289.
- Panzanelli, P., Homanics, G.E., Ottemer, O.P., Fritschy, J.M. & Sasso-Pognetto, M. (2004) Pre- and postsynaptic GABA receptors at reciprocal dendrodendritic synapses in the olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 2945-2952.
- Pinching, A.J. & Powell, T.P. (1971) The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J. Cell Sci.*, **9**, 347-377.

D2 receptor in the olfactory glomeruli 1367

- Shepherd, G.M. & Greer, C.A. (1998) Olfactory bulb. In Shepherd, G.M., (Ed), *The Synaptic Organization of the Brain*, 4th Edn. Oxford University Press, New York, pp. 159-203.
- Somogyi, P. & Hodgson, A.J. (1985) Antisera to gamma-aminobutyric acid. III. Demonstration of GABA in Golgi-impregnated neurons and in conventional electron microscopic sections of cat striate cortex. *J. Histochem. Cytochem.*, **33**, 249-257.
- Toida, K., Kosaka, K., Aika, Y. & Kosaka, T. (2000) Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb - IV. Intraglomerular synapses of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons. *Neuroscience*, **101**, 11-17.
- Van der Weide, I., Camps, M., Horn, A.S. & Palacios, J.M. (1987) Autoradiographic localization of dopamine D2 receptors in the rat brain using the new agonist [³H]N-0437. *Neurosci. Lett.*, **83**, 259-263.
- Wamsley, J.K., Gehlert, D.R., Filloux, F.M. & Dawson, T.M. (1989) Comparison of the distribution of D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat brain. *J. Chem. Neuroanat.*, **2**, 119-137.
- Wang, H. & Pickel, V.M. (2002) Dopamine D2 receptors are present in prefrontal cortical afferents and their targets in patches of the rat caudate-putamen nucleus. *J. Comp. Neurol.*, **442**, 392-404.
- Xu, S.G., Prasad, C. & Smith, D.E. (1999) Neurons exhibiting dopamine D2 receptor immunoreactivity in the substantia nigra of the mutant weaver mouse. *Neuroscience*, **89**, 191-207.
- Zhou, Y., Spangler, R., Ho, A. & Jeanne, K.M. (2001) Hypothalamic CRH mRNA levels are differentially modulated by repeated 'binge' cocaine with or without D(1) dopamine receptor blockade. *Mol. Brain Res.*, **94**, 112-118.

Migrating neuroblasts of the rostral migratory stream are putative targets for the action of nitric oxide

María Gutiérrez-Mecinas, Carlos Crespo, José Miguel Blasco-Ibáñez, Juan Nácher, Emilio Varea and Francisco José Martínez-Guijarro

Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, Street Dr Moliner 50, E-46100, Burjassot, Spain

Keywords: adult neurogenesis, cell migration, cGMP, rat, soluble guanylyl cyclase

Abstract

It has been demonstrated that the gaseous messenger nitric oxide influences cell proliferation and cell migration, and therefore affects adult neurogenesis in mammals. Here, we investigated the putative targets for this action in the rostral migratory stream of the rat. We used immunocytochemical detection of the $\beta 1$ subunit of the enzyme soluble guanylyl cyclase, which can be activated by nitric oxide. Our results under light and electron microscopy demonstrated that the migrating neuroblasts (type A cells) were $\beta 1$ -immunopositive. The astrocytes (type B cells), immature precursors (type C cells) and ependymal cells (type E cells) were $\beta 1$ -immunonegative. The neurochemical characterization of the soluble guanylyl cyclase-containing cells confirmed these results. In this regard, the $\beta 1$ -containing cells expressed doublecortin, a protein expressed by type A cells, and did not express glial fibrillary acidic protein, which is a marker for type B cells. Injection of 5-bromo-2'-deoxyuridine 2 h before killing demonstrated that proliferating cells did not contain soluble guanylyl cyclase. Finally, we found that $\beta 1$ -containing type A cells also expressed the A3 subunit of the cyclic nucleotide-gated ion channels. Altogether, the present results indicate that nitric oxide may influence adult neurogenesis acting on the migrating neuroblasts of the rostral migratory stream. In these cells, nitric oxide may activate the enzyme soluble guanylyl cyclase, triggering the production of the second messenger cGMP. In turn, cGMP might induce the opening of cyclic nucleotide-gated ion channels, which are present in these cells.

Introduction

Nitric oxide (NO) is a gaseous messenger with multiple actions in the nervous system. In the brain, a population of neurones contains the neuronal isoform of the NO synthase (nNOS) and produces this messenger. When produced, it rapidly diffuses through the biological membranes from the nNOS-containing neurones to the cells located in their neighbourhood. Under physiological conditions, NO rapidly interacts with the haeme group of haemoproteins, such as the enzyme soluble guanylyl cyclase (sGC) that is present in some cells (Davis *et al.*, 2001). The interaction with sGC leads to the activation of the enzyme and to the consequent production of the second messenger cGMP (Stone & Marletta, 1994). In turn, elevated intracellular levels of cGMP can activate cGMP-dependent protein kinases and cGMP-degrading phosphodiesterases or can open cyclic nucleotide-gated ion channels (CNGs). Through these transducers, the gaseous transmitter triggers different intracellular cascades in its targets and leads to different responses (Lucas *et al.*, 2000). Considering that most of the physiological effects of NO are mediated in the cells by activation of sGC (Krumenacker *et al.*, 2004), it is accepted that the detection of this enzyme is a valuable approach to identify targets of the action of NO in the tissues (Ding *et al.*, 2004; Gutiérrez-Mecinas *et al.*, 2005).

Recent investigations have demonstrated that NO regulates some events of the development of the nervous system, including cell proliferation, cell motility and cell migration (reviewed in Gibbs, 2003;

Bicker, 2005, 2007; Estrada & Murillo-Carretero, 2005). These events occur not only during development but also in the adult nervous system. For example, in the adult brain of mammals a continuous incorporation of newly generated neurones occurs in the circuits of the olfactory bulb. This phenomenon requires continuous proliferation of neural progenitors in the subventricular zone (SVZ) and continuous migration of neuroblasts along the rostral migratory stream (RMS) towards the olfactory bulb. In fact, it has been reported that NO acts in the cells of the SVZ and negatively influences cell proliferation in this neurogenic region (Packer *et al.*, 2003; Moreno-López *et al.*, 2004). Anatomical evidence of the targets of this action has not yet been provided, although it has been proposed that the targets of NO signalling in the SVZ might be type C cells (Moreno-López *et al.*, 2004).

To date, there are no studies analysing an action of NO in the cells of the RMS. The aim of this study was to investigate whether NO signalling can act on the cells of the RMS, providing, if possible, anatomical evidence for identifying the targets. We have investigated whether the cells of the RMS contain the transduction machinery required for supporting a regulatory action of NO. Our attention was focused on the transduction machinery that involves the activation of sGC and the production of cGMP because most of the actions of NO in the cells are mediated by this signalling pathway (Krumenacker *et al.*, 2004).

Materials and methods

Animals and tissue preparations

Twenty adult (3-month-old) male and female Wistar rats were used for this study. Five of them were injected with a single dose of 5-bromo-

Correspondence: Dr Carlos Crespo, as above.
E-mail: carlos.crespo@uv.es

Received 28 March 2007, revised 16 May 2007, accepted 30 May 2007

2'-deoxyuridine (BrdU) (100 mg/kg i.p.) 2 h before killing. All of the procedures were in accordance with the guidelines of the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and conformed to the Spanish legislation for the use and care of animals (Real Decreto 1201/2005).

The animals were deeply anaesthetized with 4% chloral hydrate in physiological saline (1 mL/100 g body weight) and intra-aortically perfused with saline for 1 min followed by 500 mL of fixative as follows. Ten animals (five control rats plus five rats injected with BrdU) were perfused with 500 mL of 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB). These animals were used for the analysis of the expression of the $\beta 1$ subunit of sGC and for the detection of the A3 subunit of the CNGs (CNGA3) under light microscopy. They were also used for the double-immunofluorescence experiments. Five additional animals were perfused with 500 mL of 4% (w/v) paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in PB. The remaining animals were first perfused with 50 mL of a mixture of 3.8% (v/v) acrolein and 2% (w/v) paraformaldehyde in PB and then with 450 mL of 2% (w/v) paraformaldehyde in PB. Animals perfused with fixatives containing either glutaraldehyde or acrolein were used for electron microscopy. After perfusion, the brains of the animals were dissected out and cut into 50- μ m-thick coronal or parasagittal sections on a vibratome (VT 1000E, Leica, Nussloch, Germany). Sections were kept in cold PB (4 °C) before processing.

Immunocytochemical detection of soluble guanylyl cyclase and cyclic nucleotide-gated ion channel A3 for light and electron microscopy

Free-floating sections from the animals perfused with the fixatives containing glutaraldehyde or acrolein were treated with 1% NaBH₄ in PB for 30 min and extensively rinsed in PB. Thereafter, the sections were cryoprotected by immersion for 1 h in 25% sucrose and 10% glycerol in 0.05 M PB and freeze-thawed three times with liquid nitrogen to enhance antibody penetration.

The avidin-biotin-immunoperoxidase method was used for immunostaining. For this method, sections were sequentially incubated in: (i) blocking solution containing 10% normal goat serum and 2% bovine serum albumin in PB for 45 min at room temperature (20°C); (ii) primary antibody diluted in PB containing 1% normal goat serum and 0.8% bovine serum albumin for 48 h at 4 °C [primary antibodies were polyclonal rabbit anti- $\beta 1$ subunit of sGC (Cayman 160897; diluted 1 : 3000) or polyclonal rabbit anti-CNGA3 (Alomone APC-060; diluted 1 : 500)]; (iii) biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories), diluted 1 : 200 in PB, for 2 h at room temperature; and (iv) avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vector Laboratories), diluted 1 : 200 in PB, for 2 h at room temperature. The peroxidase reaction was developed using 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, D5637) and 0.003% hydrogen peroxide in PB for 5 min at room temperature. Sections were carefully rinsed in PB (3 × 10 min) after each step. Following extensive washes in PB, sections were treated with 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Science, 19150) and 7% glucose in PB for 1 h at room temperature and then washed repeatedly in PB. Finally, sections were stained with uranyl acetate (Parrac) for 90 min, dehydrated through graded ethanol series, cleared in propylene oxide (Fluka AG) and flat-embedded in Durcupan (Fluka AG) between slides and coverslips. Durcupan was polymerized overnight at 60 °C.

Flat-embedded sections were examined under light microscopy and, after analysis, a few sections containing immunopositive elements from the animals perfused with the fixatives containing either

glutaraldehyde or acrolein were re-embedded in Durcupan. Re-embedded material was cut on an ultramicrotome and serial 60-nm-thick ultrathin sections were obtained and mounted on single-slot Formvar-coated nickel grids. The ultrathin sections were stained with lead citrate and analysed under electron microscopy.

Double immunocytochemistry for the detection of soluble guanylyl cyclase and doublecortin or glial fibrillary acidic protein

To characterize and identify the sGC-immunopositive elements of the RMS, we investigated the coexpression of the $\beta 1$ subunit of sGC and two different markers for the staining of the major cell types of the RMS, doublecortin (DCX) as a marker for migrating neuroblasts (type A cells) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a marker for astrocytes (type B cells).

For these experiments, double immunofluorescence was used in sections from the animals perfused with fixative without glutaraldehyde or acrolein. Free-floating sections were incubated in blocking solution containing 10% normal donkey serum and 2% bovine serum albumin in PB for 45 min at room temperature. They were then incubated in a mixture of primary antibodies diluted in PB containing 2% normal donkey serum and 0.8% bovine serum albumin for 48 h at 4 °C. The mixture of primary antibodies was made up of polyclonal rabbit anti- $\beta 1$ (diluted 1 : 1000 in the final mixture) and polyclonal goat anti-DCX (Santa Cruz SC8067; diluted 1 : 100 in the final mixture) or monoclonal mouse anti-GFAP (Sigma G3893; diluted 1 : 1000 in the final mixture). Thereafter, the sections were incubated for 2 h at room temperature in a mixture of Cy3-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Jackson Laboratories; diluted 1 : 400 in the final mixture) and Cy2-conjugated donkey anti-goat or donkey anti-mouse IgG (Jackson Laboratories; diluted 1 : 400 in the final mixture). Secondary antibodies were diluted in PB. After each step, sections were carefully washed in PB.

Finally, sections were mounted on gelatine-coated slides and coverslipped with an antifading medium (0.42 g glycine, 0.021 g sodium hydroxide, 0.51 g sodium chloride, 0.03 g sodium azide and 5 g *N*-propyl gallate in 100 mL of 70% glycerine). Double labelling was analysed under laser scanning confocal microscopy.

Double immunocytochemistry for the detection of soluble guanylyl cyclase and 5-bromo-2'-deoxyuridine

In order to test whether sGC was expressed in proliferating cells, sections from the five animals injected with BrdU were processed for the detection of the $\beta 1$ subunit of sGC and BrdU using double immunofluorescence. Before double immunocytochemistry, DNA was denatured by heating the sections for 1 h at 60 °C in PB and incubating them for 30 min at room temperature in HCl (2 N). The sections were then rinsed in PB and processed as described above. The primary antibody used for the detection of BrdU was a polyclonal rat anti-BrdU (Oxford Biotechnology OBT0030CX; diluted 1 : 1000 in the final mixture) and the secondary antibody was an Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rat IgG (Molecular Probes; diluted 1 : 400 in the final mixture). Finally, sections were mounted with the antifading medium. Double labelling was analysed under laser scanning confocal microscopy.

Double immunocytochemistry for the detection of soluble guanylyl cyclase and cyclic nucleotide-gated ion channel A3

In order to investigate the intracellular transducers for NO signalling, we analysed the expression of CNGA3 in the cells containing the $\beta 1$ subunit

of sGC using double immunofluorescence. In these experiments, all of the primary antibodies had the same origin (rabbit) and therefore a sequential method using Fab fragments of IgG was used as previously described (Gutiérrez-Mecinas *et al.*, 2005). Briefly, sections were incubated at room temperature in: (i) polyclonal rabbit anti- $\beta 1$ serum (diluted 1 : 1000 in PB) for 24 h; (ii) goat anti-rabbit Fab fragments (Jackson; diluted 1 : 100 in PB) for 2 h; (iii) Cy3-conjugated donkey anti-goat IgG (Jackson; diluted 1 : 400 in PB) for 2 h; (iv) polyclonal rabbit anti-CNGA3 (diluted 1 : 200 in PB) for 24 h; and (v) Cy2-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Jackson; diluted 1 : 400 in PB) for 2 h. After each step, sections were carefully rinsed in PB. Finally, sections were mounted with the antifading medium and double labelling was analysed under laser scanning confocal microscopy.

For all of the immunocytochemical procedures the company of origin tested the specificity of the commercial antibodies used in this study. Additional controls were performed as previously described (Crespo *et al.*, 2000).

Results

Identification of the soluble guanylyl cyclase-containing elements of the rostral migratory stream under light and electron microscopy

Anatomically, the RMS extends from the proximity of the lateral ventricle to the core of the olfactory bulb. We have included in this study the strip of tissue around the remnants of the olfactory ventricle, which anatomically are present in the deepest portion of the rat olfactory bulb. Therefore, four major cell types have been distinguished in our analysis: (i) migrating neuroblasts (type A cells); (ii) astrocytes (type B cells); (iii) immature precursors (type C cells) and (iv) ependymal cells (type E cells), found in the wall of the remnants of the olfactory ventricle.

After sGC immunocytochemistry, the presence of sGC-containing cells was homogeneous and continuous in the whole RMS (Figs 1 and 2). The 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride precipitate was dense and filled the cytoplasm of the sGC-immunopositive cells but did not fill the nuclei, which remained unstained (Figs 1 and 2). Analysing parasagittal sections under light microscopy, these cells had spindle shapes with one or two visible processes and were found grouped together and arranged in chains with their processes orientated parallel to the direction of migration along the RMS (Fig. 1). Analysing coronal sections, the sGC-containing cells showed round or ovoid shapes and were found clustered together in small groups (Fig. 2). Sometimes, these groups were adjacent to blood vessels.

The morphological features described for the sGC-containing cells under light microscopy resembled the morphology previously described for the migrating neuroblasts (type A cells) in the RMS (Lois *et al.*, 1996). We further confirmed this identity by analysing the sGC-containing cells under electron microscopy. For the ultrastructural analysis, we used the original ultrastructural descriptions by Lois *et al.* (1996) and Doetsch *et al.* (1997) as a reference.

Under electron microscopy, it was confirmed that the sGC-containing cells were migrating neuroblasts (type A cells). They showed smooth contours and were separated one from another by evident open extracellular spaces (Fig. 3A and B), although two sGC-containing cells were occasionally found attached by small and punctate zonula adherent-like contacts. The 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride precipitate filling the cytoplasm of the sGC-containing cells made the visualization of some ultrastructural details difficult, such as the presence of abundant microtubules and free ribosomes, which are salient features of type A cells under electron microscopy. However, the nuclei were not

masked by the 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride precipitate and could be clearly visualized. These nuclei had abundant lax chromatin, sparse heterochromatin and occasional invaginations, as has been described for the nuclei of type A cells. Altogether, the ultrastructural features of the sGC-containing cells indicated that most, if not all, were migrating neuroblasts (type A cells).

The expression of sGC was also investigated under electron microscopy in the rest of the cell types that integrate the RMS. Type B cells were identified by their irregular contours, processes flanking the chains of type A cells and electron-lucent cytoplasm containing bundles of intermediate filaments of GFAP. These cells were sGC-immunonegative (Fig. 3C and D). Type C cells were distinguishable by their atypical and large reticulated nucleolus, large Golgi apparatus and cytoplasm, less electron-lucent than the cytoplasm of type B cells. Similarly to type B cells, type C cells did not show sGC immunoreactivity (Fig. 4A). Finally, type E cells were unequivocally identified because they contacted the remnants of the olfactory ventricle. Moreover, they were easily recognizable by their electron-lucent cytoplasm containing many mitochondria and their multiple cilia located in the surface of the cell that is exposed to the ventricular cavity. Type E cells were also sGC-immunonegative (Fig. 4).

Neurochemical characterization of the soluble guanylyl cyclase-containing cells

Although electron microscopy clearly demonstrated that the sGC-containing cells of the RMS were migrating neuroblasts (type A cells), we further confirmed this result by making a neurochemical characterization of these elements. We used DCX and GFAP as neurochemical markers for the two major cell types present in the RMS, type A and type B cells. The protein DCX is widely expressed by migrating neuroblasts (type A cells) (Nicher *et al.*, 2001). However, GFAP is expressed by type B cells (Lois *et al.*, 1996). Double $\beta 1$ /DCX immunofluorescence demonstrated that most, if not all, of the sGC-containing cells were DCX-immunopositive in the RMS (Fig. 5A-C). This finding confirmed that these cells were migrating neuroblasts (type A cells). However, double $\beta 1$ /GFAP immunofluorescence demonstrated that the sGC-containing cells did not contain GFAP immunoreactivity (Fig. 5D-F). This finding confirmed that astrocytes (type B cells) did not express sGC.

Analysis of the expression of soluble guanylyl cyclase in the proliferating cells of the rostral migratory stream

To investigate the expression of sGC in proliferating cells, BrdU was injected in five rats 2 h before killing (see Materials and methods). Afterwards, the incorporation of BrdU in the DNA of the sGC-containing cells was analysed in sections from these rats using $\beta 1$ /BrdU double immunofluorescence. BrdU-immunopositive cells were found throughout the whole RMS. Of these, 50 cells were randomly selected at different rostro-caudal levels and analysed for the presence of sGC immunostaining. We did not find $\beta 1$ /BrdU double-immunostained cells (Fig. 5G-I). These data indicated that sGC is not expressed in the proliferating cells of the RMS.

Expression of cyclic nucleotide-gated ion channel A3 in the soluble guanylyl cyclase-containing cells of the rostral migratory stream

On the one hand, our results indicated that the migrating neuroblasts (type A cells) contained sGC and therefore could be affected by NO

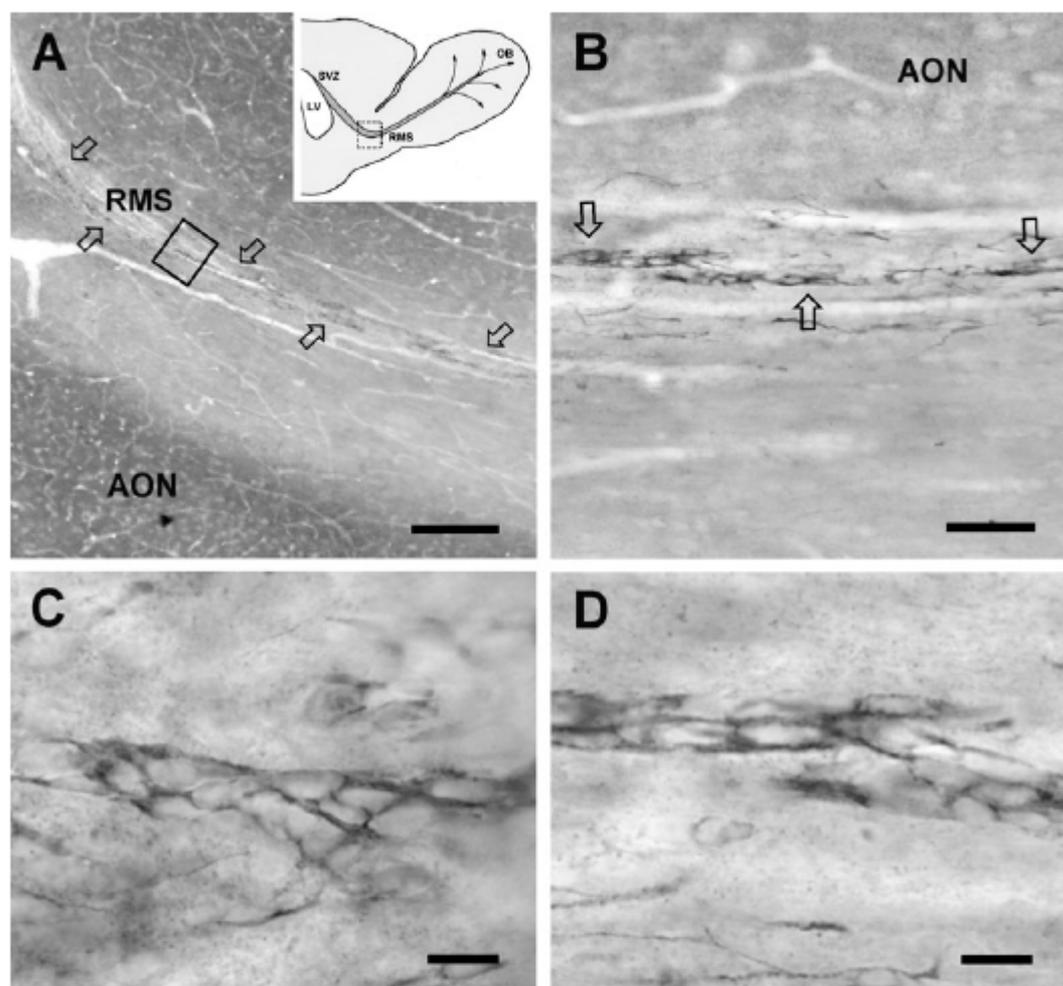


FIG. 1. Soluble guanylyl cyclase (sGC)-containing cells of the rostral migratory stream (RMS) under light microscopy in parasagittal sections. (A) Semipanoramic view showing the sGC immunoreactivity in the RMS (arrows). The image was taken at the level of the boxed area of the drawing. In turn, the area boxed in the micrograph represents the field shown at higher magnification in B–D. (B) The sGC-containing cells are arranged in chains along the RMS (arrows). (C and D) Detailed views of the chains of sGC-containing cells. These cells show the same spindle shape and morphology as type A cells. AON, anterior olfactory nucleus; LV, lateral ventricle; OB, olfactory bulb; SVZ, subventricular zone. Scale bars: 250 μm (A); 50 μm (B); 10 μm (C and D).

producing the second messenger cGMP. On the other hand, the CNGs are intracellular transducers for the cGMP effects. Therefore, it was interesting to investigate whether the sGC-containing cells of the RMS also expressed CNGs. To solve this point, we analysed the expression of CNGA3 in the cells of the RMS. Under light microscopy, an elevated number of CNGA3-containing cells were found in the entire RMS (Fig. 6A and B). In parasagittal sections, the stained cells showed spindle shapes and were arranged in chains. In coronal sections, they showed ovoid shapes and were grouped together in small clusters, sometimes associated with blood vessels. These morphological features were coincident with the morphology described for the sGC-containing type A cells. Moreover, electron microscopy demonstrated that the cells

expressing CNGA3 showed the salient features of the migrating neuroblasts (Fig. 6C). The other cell types of the RMS, including type B (Fig. 6D), type C and type E cells, were CNGA3-immunonegative. Using $\beta 1$ /CNGA3 double immunofluorescence, we found that most, if not all, of the cells that expressed sGC in the RMS also contained CNGA3 (Fig. 5J–L).

Discussion

The novel finding of the present study is that the migrating neuroblasts of the RMS (type A cells) contain sGC and therefore can be influenced by NO, thus producing the second messenger cGMP.

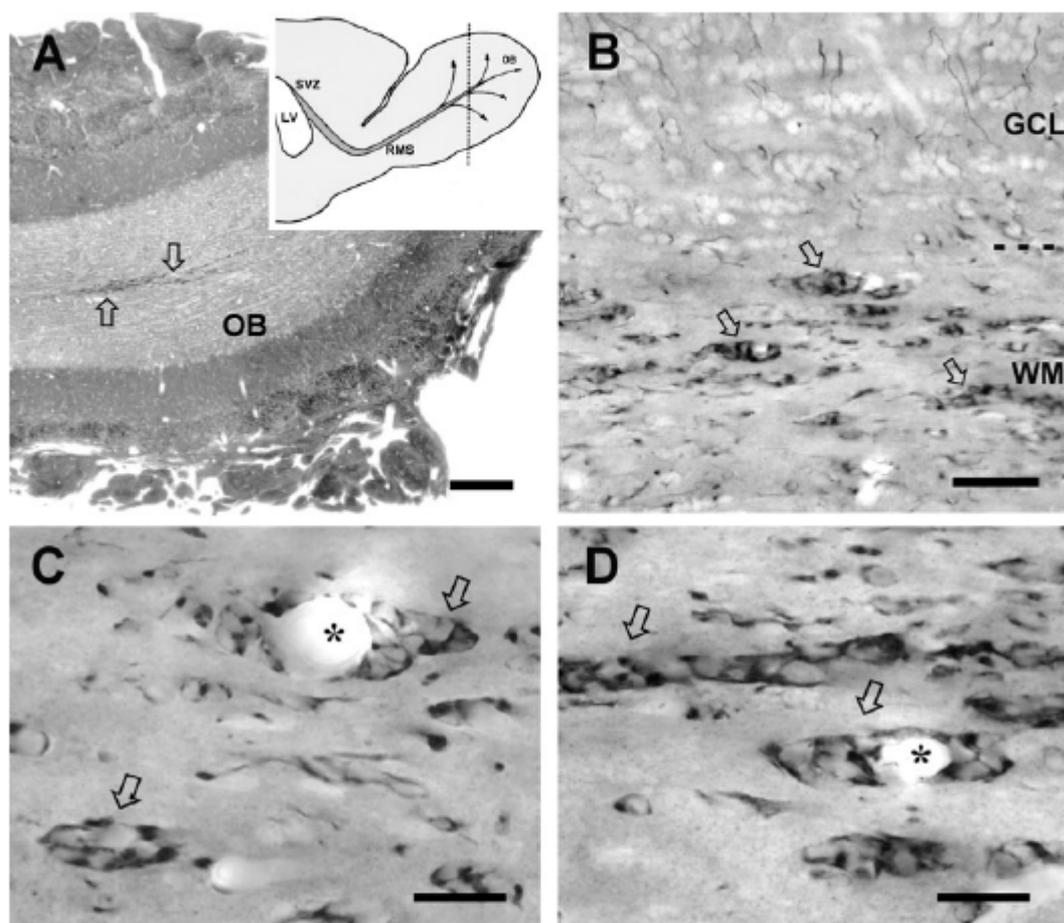


FIG. 2. Soluble guanylyl cyclase (sGC)-containing cells of the rostral migratory stream (RMS) under light microscopy in coronal sections. (A) Semiparaventricular view showing the most rostral portion of the RMS (arrows) in the core of the olfactory bulb (OB). The micrograph was taken at the level indicated in the drawing. (B) At this level, the sGC-containing cells (arrows) are located in the deepest layers of the OB. (C and D) Detailed views of the sGC-containing cells show their round or ovoid shapes in the coronal sections. Note that the cells are clustered in groups (arrows) and that these groups are frequently adjacent to the blood vessels (*). GCL, granule cell layer of the OB; LV, lateral ventricle; SVZ, subventricular zone; WM, white matter of the OB. Scale bars: 250 μ m (A); 50 μ m (B); 25 μ m (C and D).

Moreover, the present data support the hypothesis that at least CNGs may be the intracellular transducers for cGMP in type A cells. Altogether, our investigation provides the anatomical basis to demonstrate that NO can participate in the control of adult neurogenesis through the sGC/cGMP signalling pathway, probably affecting cell migration, as we will discuss below.

Identification of the β 1-containing cells in the rostral migratory stream

The cell typology of the RMS is similar to that described in the SVZ (Gritti *et al.*, 2002). The two major cell types found in the RMS are the migrating neuroblasts (type A cells) and astrocytes (type B cells) (Lois *et al.*, 1996; Doetsch *et al.*, 1997; reviewed in García-Verdugo *et al.*,

1998 and Alvarez-Buylla & García-Verdugo, 2002; Gritti *et al.*, 2002). Type A cells are assembled in chains and these chains are ensheathed by type B cells, constituting the tube-like structures that integrate the RMS. Moreover, the entire RMS, including the most rostral portion within the olfactory bulb, also contains immature and highly proliferative neuronal precursors (type C cells) (Gritti *et al.*, 2002), which form clusters next to the chains of type A cells. Finally, at the most rostral levels of the RMS, some ependymal cells (type E cells) are located covering the walls of the remnants of the olfactory ventricle that is present in the deepest portion of the olfactory bulb (Gritti *et al.*, 2002).

Taking this cell typology into account, we identified the sGC-containing cells as migrating neuroblasts (type A cells) on the basis of morphological and ultrastructural criteria as previously reported (Lois *et al.*, 1996; Doetsch *et al.*, 1997; García-Verdugo *et al.*, 1998).

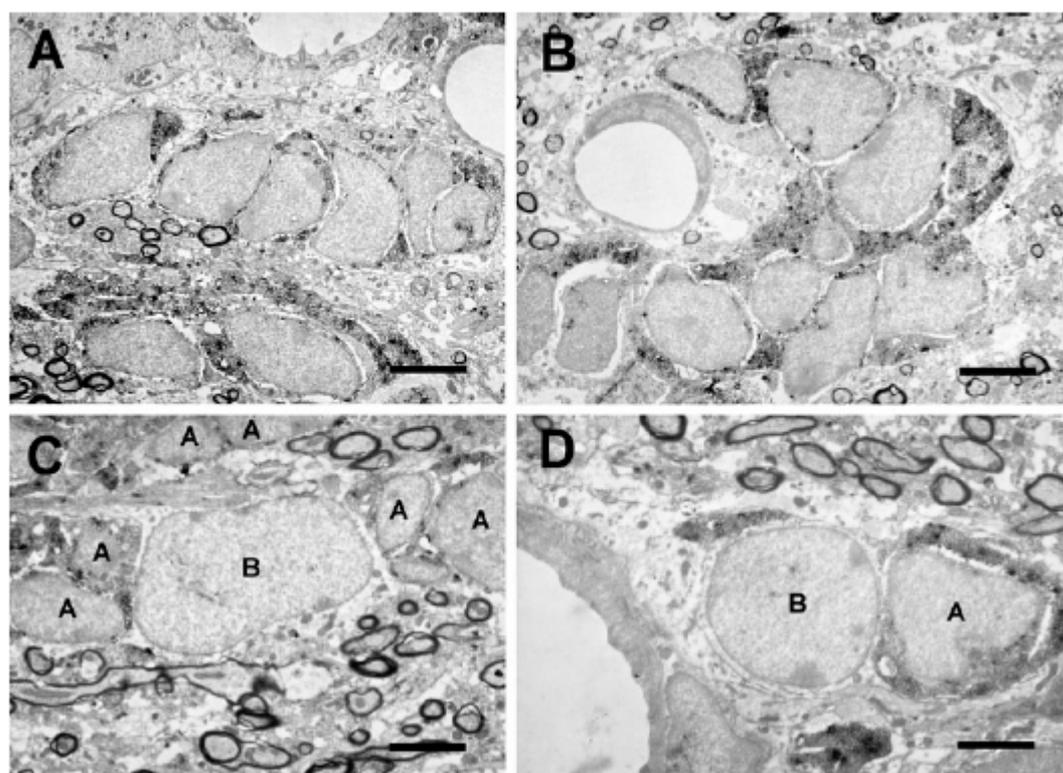


FIG. 3. Soluble guanylyl cyclase (sGC) immunoreactivity in the rostral migratory stream under electron microscopy. (A and B) The ultrastructure of the sGC-containing cells coincides with that of the type A cells. Note the intercellular spaces that separate the immunopositive elements from each other. (C and D) Type B cells (B) are easily identified under electron microscopy. They are sGC-immunonegative in contrast to type A cells (A). Scale bars: 5 μm (A-C); 3 μm (D).

However, we conclude that the immature neuronal precursors (type C cells), astrocytes (type B cells) and ependymal cells (type E cells) do not contain sGC. These data have been further confirmed by neurochemical criteria. On the one hand, DCX is expressed by type A cells in the SVZ and RMS (Nichter *et al.*, 2001). We found that the sGC-containing cells of the RMS are DCX immunopositive and are therefore type A cells. On the other hand, GFAP is expressed by type B and type E cells (Doetsch *et al.*, 1997) and has been used to confirm that these two cell types do not express sGC. At present, there is no neurochemical marker that specifically and exclusively stains the immature neuronal precursors (type C cells). Nevertheless, we can assume that most of the BrdU-containing cells found in the RMS 2 h after the intraperitoneal injection of BrdU should be type C cells, as type C cells are actively proliferating cells (Doetsch *et al.*, 1997). The lack of BrdU/ β 1 double-stained cells in the RMS indicates that type C cells do not express sGC. In conclusion, our data support sGC being specifically and exclusively expressed by type A cells in the RMS.

Role of nitric oxide in neurogenesis: nitric oxide and cell proliferation

It has been widely reported in the literature that NO can regulate cell proliferation in the mammalian brain during development and

adulthood. Cell proliferation is negatively regulated by NO during the perinatal development of the rat cerebellum (Ciarri *et al.*, 2006) or during the embryonic development of the chick retina (Magalhães *et al.*, 2006). This gaseous messenger has also been related to the control of cell proliferation in the two neurogenic regions of the adult brain of mammals, the SVZ (Cheng *et al.*, 2003; Packer *et al.*, 2003; Matarredona *et al.*, 2004, 2005; Moreno-López *et al.*, 2004; Cárdenas *et al.*, 2005; Estrada & Murillo-Carretero, 2005; Romero-Grimakli *et al.*, 2006; Torroglosa *et al.*, 2007) and the dentate gyrus of the hippocampus (Packer *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2003, 2006; Reif *et al.*, 2004). In both neurogenic systems, an antiproliferative effect of NO has been described in physiological conditions. For example, Packer *et al.* (2003) found that the number of newly generated cells in the neurogenic regions of a nNOS knockout mouse strain is dramatically increased. Moreover, it has been demonstrated that the systemic or local pharmacological inhibition of NO synthesis causes an increase of neuronal precursor proliferation in the SVZ and dentate gyrus using *in-vitro* and *in-vivo* models (Cheng *et al.*, 2003; Packer *et al.*, 2003; Matarredona *et al.*, 2004; Moreno-López *et al.*, 2004; Romero-Grimakli *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2006; Torroglosa *et al.*, 2007).

In the opposite direction, it has also been described that NO could increase neuronal precursor proliferation, at least during early postnatal development (Chen *et al.*, 2004) and after brain injury

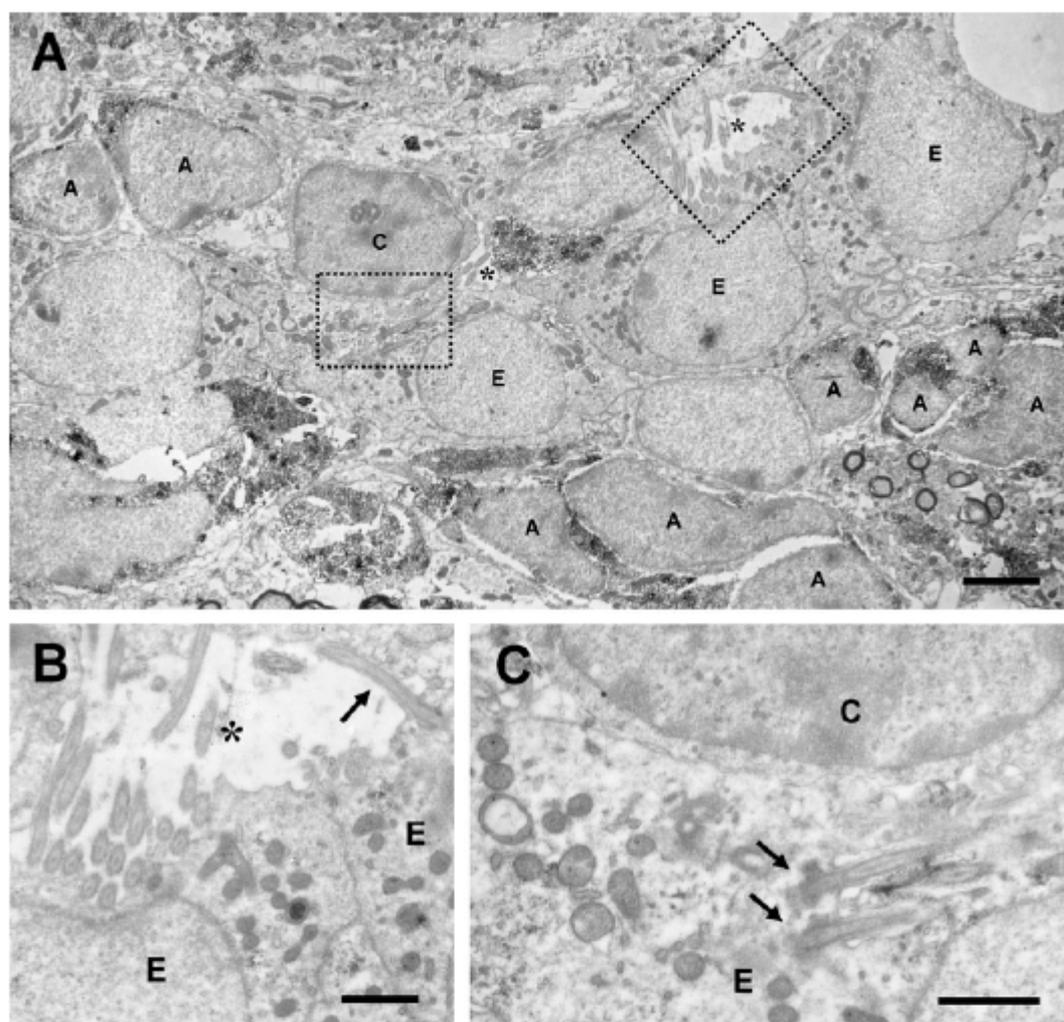


FIG. 4. Soluble guanylyl cyclase (sGC) immunoreactivity in the rostral migratory stream (RMS) under electron microscopy. (A) Semipanoramic view of the most rostral portion of the RMS. Type A cells (A) are sGC-immunopositive. In contrast, type C cells (C) and type E cells (E), which are easily identifiable by ultrastructural criteria, do not show sGC immunoreactivity. *Remnants of the olfactory ventricle. The boxed areas shown are magnified in B and C. (B and C) The cilia of the type E cells (arrows) are perfectly distinguishable in the remnants of the olfactory ventricle (*). Note that the cytoplasm of the type E and type C cells laces 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride precipitate. Scale bar: 5 μm (A); 2 μm (B); 1 μm (C).

(Zhu *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). For example, it has been demonstrated that an increase of NO synthesis caused by activation of the inducible isoform of the NO synthase (NOS) after ischemic insult is coupled with an increased cell proliferation in the dentate gyrus (Zhu *et al.*, 2003). Moreover, other studies indicate that the absence of the endothelial isoform of the NOS (eNOS) decreases neurogenesis in the dentate gyrus (Reif *et al.*, 2004) and SVZ (Chen *et al.*, 2005). This discrepancy, arising from opposite results in the literature, has recently been discussed considering a dual role of NO in cell proliferation,

depending on which isoform of NOS is the source of the gaseous messenger (Sun *et al.*, 2005; reviewed in Cárdenas *et al.*, 2005).

Whatever the case, the putative targets for an action of NO in cell proliferation could be proliferating cells. In the SVZ/RMS neurogenic system, it has been demonstrated that the astrocytes (type B cells) act as the neural stem cells and generate the immature neuronal precursors (type C cells), which, in turn, generate the migrating neuroblasts (type A cells) (Doetsch *et al.*, 1999; Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo, 2002). It has also been demonstrated that type B, type C and

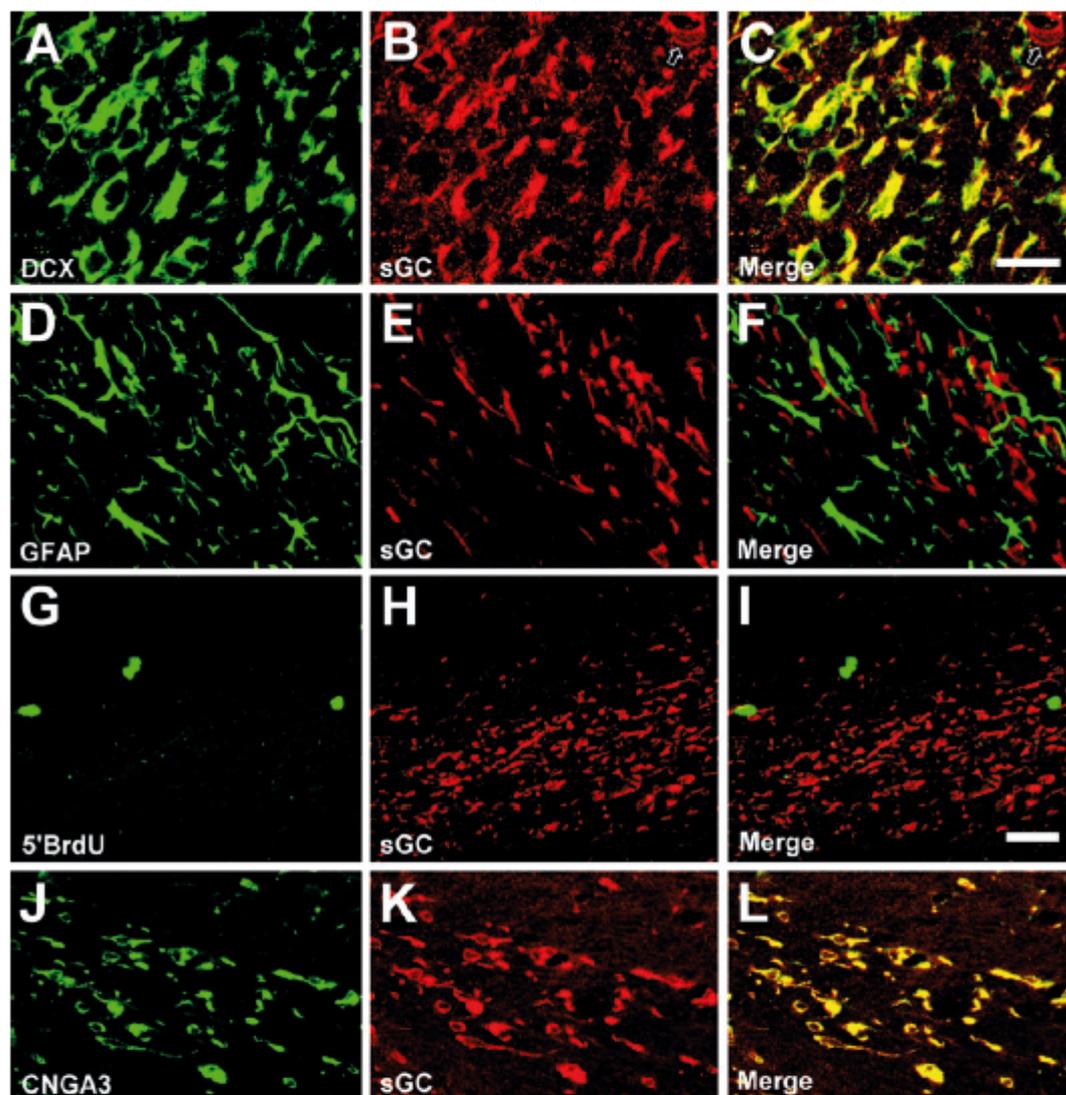


FIG. 5. Neurochemical characterization of the soluble guanylyl cyclase (sGC)-containing cells of the rostral migratory stream (RMS). (A–C) Double immunofluorescence demonstrates that the sGC-containing cells of the RMS (sGC) contain doublecortin (DCX). Note a pericyte that contains sGC and is DCX-immunonegative (arrows in B and C). (D–F) The sGC-containing cells are glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunonegative. (G–I) There is no sGC immunoreactivity in the 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-containing cells. (J–L) All of the sGC-containing cells of the RMS are immunopositive for the α_3 subunit of the cyclic nucleotide-gated ion channel (CNGA3). Scale bar: 25 μ m (A–F); 50 μ m (G–L).

type A cells can divide (Doetsch *et al.*, 1997; García-Verdugo *et al.*, 1998). Doetsch *et al.* (1997) have described that type C cells are the most actively proliferating cells in the SVZ and Moreno-López *et al.* (2004) have considered that type C cells should be the targets for the antiproliferative action that they describe for NO. Moreover, it has been proposed that the cellular mechanism underlying the antiproliferative action of NO in these cells involves the inhibition of the

epidermal growth factor receptor by S-nitrosylation (Romero-Grimalki *et al.*, 2006; Torroglosa *et al.*, 2007) and does not involve cGMP synthesis (Torroglosa *et al.*, 2007). The lack of expression of sGC that we have found in type C cells is in close agreement with the idea that the antiproliferative action of NO in type C cells is not mediated by activation of sGC and production of cGMP, as reported by Torroglosa *et al.* (2007). Furthermore, the lack of sGC in the BrdU-containing

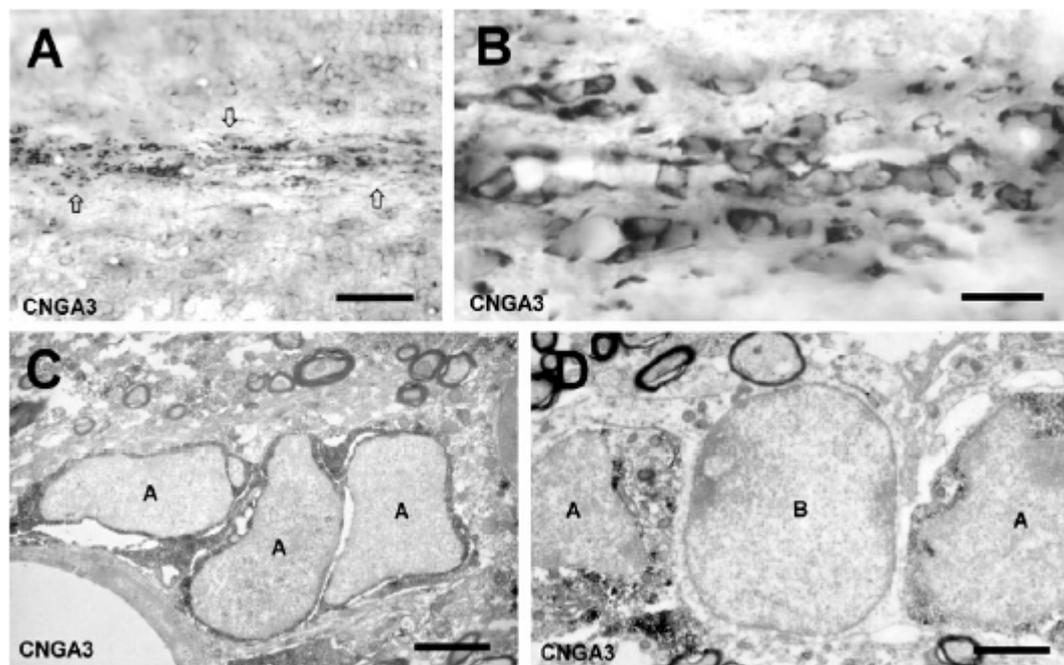


FIG. 6. Expression of the A3 subunit of the cyclic nucleotide-gated ion channel (CNGA3) in the soluble guanylyl cyclase-containing cells of the rostral migratory stream (RMS). (A) The RMS (arrows) is strongly stained after CNGA3 immunocytochemistry. (B) The CNGA3-immunopositive elements show the morphology of type A cells under light microscopy. (C) Electron microscopy confirms that the CNGA3-containing cells are type A cells (A). (D) Type B cells (B) are CNGA3-immunonegative. Scale bars: 100 μm (A); 25 μm (B); 5 μm (C); 2.5 μm (D).

cells that we have analysed supports NO/sGC/cGMP signalling not having a role in the proliferating cells of the RMS.

Our present results strongly suggest that NO can have an effect other than the inhibition of cell proliferation in the SVZ/RMS neurogenic system. Our data demonstrate that this effect may be exerted in type A cells by means of the activation of the enzyme sGC. As type A cells are migrating neuroblasts and therefore migrate long distances from the SVZ to the olfactory bulb through the RMS, we propose that the role of NO in these cells should be related to cell migration rather than to cell proliferation.

In conclusion, a dual action of NO seems to exist in the SVZ/RMS neurogenic system. On the one hand, NO may regulate cell proliferation of type C cells through a mechanism that involves the S-nitrosylation of proteins (Moreno-López *et al.*, 2004; Romero-Grimaldi *et al.*, 2006; Torrogosa *et al.*, 2007). On the other hand, it might regulate cell migration of type A cells through the sGC/cGMP pathway (present data).

Role of nitric oxide in neurogenesis: nitric oxide and cell migration

The regulation of cell migration is a widely reported action of NO. Although much attention has been devoted to the role of the gaseous messenger in the migration of endothelial cells, in relation to angiogenesis, there is also evidence of its involvement in the migration of cells in the nervous system (Tanaka *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1995; Scott &

Hansen, 1997; reviewed by Contestabile, 2000; Gibson *et al.*, 2001; Duan *et al.*, 2003; Haase & Bicker, 2003; reviewed by Bicker, 2005, 2007; Chen *et al.*, 2005). For example, Gibson *et al.* (2001) demonstrated that NO released from the olfactory axons is a signal to induce the migration of glial cells during the formation of the antenna lobe in the olfactory system of *Manduca sexta*. In addition, an elegant study by Haase & Bicker (2003), using an insect embryo model, unequivocally demonstrated that NO regulates neuronal migration. Moreover, these authors concluded that the effect of NO is mediated by the activation of sGC and production of cGMP. They demonstrated that the pharmacological inhibition of NOS or sGC blocks neuronal migration, whereas the blockage can be rescued by supplementing sGC activators or cGMP (Haase & Bicker, 2003; reviewed in Bicker, 2005, 2007). In the development of the cerebellum of the rat, Tanaka *et al.* (1994) demonstrated that the inhibition of NOS or addition of NO scavengers decreased the migration of granule cells. Scott *et al.* (1995) reported that NO is necessary for neuronal migration in the adult mammalian brain following injury. Altogether these data, obtained from different models, indicate that NO signalling is permissive for cell migration in the nervous system. Here, we demonstrate that, specifically, the migrating neuroblasts of the RMS contain sGC and can therefore be responsive to NO. This finding suggests a functional involvement of NO/sGC/cGMP signalling in the migration of the type A cells through the RMS.

The role of NO in the migration of cells of the SVZ and RMS has been previously analysed and remains controversial. On the one hand, Moreno-López *et al.* (2004) reported that NO does not affect the

migration of cells in the RMS. In their study, these authors injected BrdU and then induced chronic inhibition of NOS with L-NAME for 7–15 days. They then analysed the density of BrdU-positive cells at these survival times and did not detect significant changes in the density of BrdU-positive cells found in the RMS and in the olfactory bulb of the L-NAME animals vs. controls. In the light of these results, they concluded that NO does not affect the migration of SVZ postmitotic cells. On the other hand, Chen *et al.* (2005) reported that NO influences the migration of the cells of the SVZ. In their investigation, these authors demonstrated that SVZ explant cell migration is significantly decreased in mice that lack the eNOS. They concluded that eNOS clearly influences cell migration in the SVZ cells. Interestingly, migrating neuroblasts containing the machinery to respond to NO signalling (i.e. sGC and CNGs) are clustered together in small groups adjacent to blood vessels (Figs 2 and 3) and can therefore be exposed to the NO produced by the eNOS from these vessels, as we discuss in the next section.

Sources of nitric oxide in the rostral migratory stream

An interesting point to solve to better understand the role of NO in the regulation of adult neurogenesis is to identify the source of NO in the neurogenic regions. Previous studies demonstrated the presence of nNOS-containing neurones surrounding the RMS, all along its rostro-caudal extension (Moreno-López *et al.*, 2000). Moreover, the expression of nNOS is evident from P10 (Racekova *et al.*, 2003) and persists throughout the entire life of the animal (Racekova *et al.*, 2005). These anatomical data indicate that the cells of the RMS can be under the influence of the NO produced by the nNOS-containing neurones. Another putative source of NO in the RMS is the endothelial cells of the blood vessels. Two facts indicate that NO produced from the blood vessels can influence the migrating neuroblasts of the RMS. First, migrating neuroblasts are frequently associated with blood vessels and are therefore exposed to the action of NO produced from the eNOS. Second, the investigations of Chen *et al.* (2005) using eNOS knockout mice clearly indicated that the absence of eNOS impairs the migration of cells from SVZ explants.

Involvement of the cyclic nucleotide-gated ion channels as intracellular transducers for the nitric oxide signalling

The CNGs are among the intracellular transducers for NO/sGC/cGMP signalling. The CNGs are nonselective cation channels that are directly activated by cyclic nucleotides, including both cAMP and cGMP (Kaupp & Seifert, 2002 for an extensive review). One of the major properties of the CNGs is to allow the entrance of calcium and this cation plays a key role in some cellular events, including cell migration (Komuro & Kumada, 2005). Interestingly, Michalakis *et al.* (2005) using CNGA3-deficient mice demonstrated that CNGA3 appears to be essential for normal postnatal migration of cones in the retina. Therefore, CNGs were reasonable candidates for us to explore as intracellular transducers for NO/sGC/cGMP signalling in type A cells.

We have demonstrated that type A cells of the RMS strongly express CNGA3. Thus, we propose that the migrating neuroblasts can respond to NO activating the production of cGMP, which, in turn, could activate the opening of CNGs allowing the entrance of calcium into the cells. It has been widely reported that calcium signalling acts as a mediator for controlling the migration of immature neurones (reviewed by Komuro & Kumada, 2005). For example, changes in the gradients of intracellular calcium within the cell somata of granule

cells of the cerebellum reverse the direction of their movement (Xu *et al.*, 2004). Moreover, it has been demonstrated that these cells exhibit a distinct pattern of transient calcium elevations as they migrate in different cortical layers (Kumada & Komuro, 2004). In a similar way, transient intracellular calcium fluctuations could be crucial for guiding migrating neuroblasts through the RMS towards their final emplacement in the olfactory bulb. In this regard, NO/sGC/cGMP signalling and CNGs can constitute an effective system to obtain rapid and precise fluctuations of intracellular calcium.

The present study demonstrates that the RMS is an excellent model to analyse the functional implications of NO/sGC/cGMP signalling in cell migration and adult neurogenesis. Our anatomical data may constitute a basis for the design of future investigations of this interesting topic.

Acknowledgements

This study was supported by the Spanish MEC (BFU2004-00931 and BFU2006-07313/BFI) and the Generalitat Valenciana (GV04A-076, GV04A-134, Grupos 03/119, ACOMP06/093 and ACOMP/2007/169). M.G.-M. is a recipient of an FPU fellowship from the Spanish MEC. The electron microscopy and laser scanning confocal microscopy analysis were performed at the SCSIE of the Universidad de Valencia.

Abbreviations

BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; CNG, cyclic nucleotide-gated ion channel; CNGA3, A3 subunit of the cyclic nucleotide-gated ion channel; DCX, doublecortin; eNOS, endothelial isoform of the nitric oxide synthase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; nNOS, neuronal isoform of the nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; PB, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4; RMS, rostral migratory stream; sGC, soluble guanylyl cyclase; SVZ, subventricular zone.

References

- Alvarez-Buylla, A. & Garcia-Verdugo, J.M. (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.*, **22**, 629–634.
- Bicker, G. (2005) STOP and GO with NO: nitric oxide as a regulator of cell motility in simple brains. *Bioessays*, **27**, 495–505.
- Bicker, G. (2007) Pharmacological approaches to nitric oxide signalling during neural development of locusts and other model insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **64**, 43–58.
- Cisternas, A., Moro, M.A., Hurtado, O., Leza, J.C. & Llinasain, I. (2005) Dual role of nitric oxide in adult neurogenesis. *Brain Res. Rev.*, **50**, 1–6.
- Chen, J., Tu, Y., Moon, C., Matarazzo, V., Palmer, A.M. & Rennett, G.V. (2004) The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance. *Dev. Biol.*, **269**, 165–182.
- Chen, J., Zacharek, A., Zhang, C., Jiang, H., Li, Y., Roberts, C., Lu, M., Kapite, A. & Chopp, M. (2005) Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J. Neurosci.*, **25**, 2366–2375.
- Cheng, A., Wang, S., Cai, J., Rao, M.S. & Mattson, M.P. (2003) Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev. Biol.*, **258**, 319–333.
- Ciani, E., Calvane, V., Crochemore, C., Baresaghi, R. & Contestabile, A. (2006) Proliferation of cerebellar precursor cells is negatively regulated by nitric oxide in newborn rat. *J. Cell Sci.*, **119**, 3161–3170.
- Contestabile, A. (2000) Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res. Rev.*, **32**, 476–509.
- Crespo, C., Blasco-Ibáñez, J.M., Britón, J.G., Alonso, J.R., Domínguez, M.I. & Martínez-Guijarro, F.J. (2000) Subcellular localization of m2 muscarinic receptor in GABAergic interneurons of the olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 3963–3974.
- Davis, K.L., Martin, E., Turko, I.V. & Murad, F. (2001) Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**, 203–236.

- Ding, J.D., Burente, A., Nedvetsky, P.I., Schmidt, H.H. & Weinberg, R.J. (2004) Distribution of soluble guanylyl cyclase in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **472**, 437–448.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.*, **17**, 5046–5061.
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, **97**, 703–716.
- Duan, Y., Haugabook, S.J., Sahley, C.L. & Muller, K.J. (2003) Methylene blue blocks cGMP production and disrupts directed migration of microglia to nerve lesions in the leech CNS. *J. Neurobiol.*, **57**, 183–192.
- Estrada, C. & Murillo-Carretero, M. (2005) Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist*, **11**, 294–307.
- García-Verdugo, J.M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D.A. & Alvarez-Buylla, A. (1998) Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J. Neurobiol.*, **36**, 234–248.
- Gibbs, S.M. (2003) Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. *Mol. Neurobiol.*, **27**, 107–120.
- Gibson, N.J., Rösler, W., Nighom, A.J., Oland, L.A., Hildebrand, J.G. & Tolbert, L.P. (2001) Neuro-glia communication via nitric oxide is essential in establishing antennal-lobe structure in *Manduca sexta*. *Dev. Biol.*, **240**, 326–339.
- Grim, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caillé, I., Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A., Galli, R., Garcia-Verdugo, J.M., Herrera, D.G. & Vescovi, A.L. (2002) Multipotent neural stem cells reside in the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J. Neurosci.*, **22**, 437–445.
- Gutiérrez-Mecinas, M., Crespo, C., Blasco-Edelz, J.M., Gracia-Llanes, E.J., Marqués-Mari, A.I. & Martínez-Guijarro, F.J. (2005) Soluble guanylyl cyclase appears in a specific subset of periglomerular cells in the olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 1443–1448.
- Hause, A. & Bicker, G. (2003) Nitric oxide and cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo. *Development*, **130**, 3977–3987.
- Kaupp, U.B. & Seifert, R. (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.*, **82**, 769–824.
- Komuro, H. & Kumada, T. (2005) Ca^{2+} transients control CNS neuronal migration. *Cell Calcium*, **37**, 387–393.
- Krumenacker, J.S., Hanafy, K.A. & Murad, F. (2004) Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res. Bull.*, **62**, 505–515.
- Kumada, T. & Komuro, H. (2004) Completion of neuronal migration regulated by loss of Ca^{2+} transients. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 8479–8484.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science*, **271**, 978–981.
- Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazemian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K.P. & Waldman, S.A. (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.*, **52**, 375–413.
- Magalhães, C.R., Socolato, R.E. & Paes-de-Carvalho, R. (2006) Nitric oxide regulates the proliferation of chick embryo retina cells by a cyclic GMP-independent mechanism. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **24**, 53–60.
- Matarredona, E.R., Murillo-Carretero, M., Moreno-López, B. & Estrada, C. (2004) Nitric oxide synthesis inhibition increases proliferation of neural precursors isolated from the postnatal mouse subventricular zone. *Brain Res.*, **995**, 274–284.
- Matarredona, E.R., Murillo-Carretero, M., Moreno-López, B. & Estrada, C. (2005) Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. *Brain Res. Rev.*, **49**, 355–366.
- Michalakis, S., Geiger, H., Haverkamp, S., Hofmann, F., Gerstner, A. & Bied, M. (2005) Impaired opsin targeting and cone photoreceptor migration in the retina of mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNGA3. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **46**, 1516–1524.
- Moreno-López, B., Noval, J.A., González-Bonet, I. & Estrada, C. (2000) Morphological bases for a role of nitric oxide in adult neurogenesis. *Brain Res.*, **869**, 244–250.
- Moreno-López, B., Romero-Gimaldi, C., Noval, J.A., Murillo-Carretero, M., Matarredona, E.R. & Estrada, C. (2004) Nitric oxide is a physiological inhibitor of neurogenesis in the adult mouse subventricular zone and olfactory bulb. *J. Neurosci.*, **24**, 85–95.
- Nácher, J., Crespo, C. & McEwen, B.S. (2001) Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 629–644.
- Packer, M.A., Stasiv, Y., Benmass, A., Chmielnicki, E., Ginsberg, A., Westphal, H., Goldman, S.A. & Enikolopov, G. (2003) Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 9566–9571.
- Rackova, E., Orndacova, J., Martonikova, M. & Vinicky, I. (2003) NADPH-diaphorase positivity in the rostral migratory stream of the developing rat. *Dev. Brain Res.*, **146**, 131–134.
- Rackova, E., Martonikova, M., Mitzuskova, B., Cizkova, D. & Orndacova, J. (2005) Age-related changes of NADPH-diaphorase positivity in the rostral migratory stream. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **25**, 1093–1105.
- Reif, A., Schmitt, A., Fritzen, S., Chouhagi, S., Bartsch, C., Urani, A., Wycisko, M., Mowrer, R., Sommer, C., Gass, P. & Lesch, K.P. (2004) Differential effect of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) on the regulation of adult neurogenesis and behaviour. *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 885–895.
- Romero-Gimaldi, C., Ghesu, G., Lledo, P.M. & Estrada, C. (2006) Chronic inhibition of nitric oxide synthesis enhances both subventricular zone neurogenesis and olfactory learning in adult mice. *Eur. J. Neurosci.*, **24**, 2461–2470.
- Scott, D.E. & Hansen, S.L. (1997) Post-traumatic regeneration, neurogenesis and neuronal migration in the adult mammalian brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **21**, 249–261.
- Scott, D.E., Wu, W., Shaver, J., Depto, A. & Hansen, S. (1995) Neural regeneration and neuronal migration following injury. I. The endocrine hypothalamus and neurohypophysial system. *Exp. Neurol.*, **131**, 23–38.
- Stone, J.R. & Marletta, M.A. (1994) Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, **33**, 5636–5640.
- Sun, Y., Jin, K., Childs, J.T., Xie, L., Mao, X.O. & Greenberg, D.A. (2005) Neuronal nitric oxide synthase and ischemia-induced neurogenesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **25**, 485–492.
- Tanaka, M., Yoshida, S., Yam, M. & Hanaoka, F. (1994) Roles of endogenous nitric oxide in cerebellar cortical development in slice cultures. *Neuroreport*, **5**, 2049–2052.
- Torroglosa, A., Murillo-Carretero, M., Romero-Gimaldi, C., Matarredona, E.R., Campos-Caro, A. & Estrada, C. (2007) Nitric oxide decreases subventricular zone stem cell proliferation by inhibition of epidermal growth factor receptor and phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway. *Stem Cells*, **25**, 88–97.
- Xu, H.T., Yuan, X.B., Guan, C.B., Duan, S., Wu, C.P. & Feng, L. (2004) Calcium signaling in chemorepellent Slit2-dependent regulation of neuronal migration. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 4296–4301.
- Zhu, D.Y., Liu, S.H., Sun, H.S. & Lu, Y.M. (2003) Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus. *J. Neurosci.*, **23**, 223–229.
- Zhu, X.J., Hua, Y., Jiang, J., Zhou, Q.G., Luo, C.X., Han, X., Lu, Y.M. & Zhu, D.Y. (2006) Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide inhibits neurogenesis in the adult dentate gyrus by down-regulating cyclic AMP response element binding protein phosphorylation. *Neuroscience*, **141**, 827–836.

Title:**Distribution of the A3 subunit of the cyclic nucleotide-gated ion channels in the main olfactory bulb of the rat****Authors:**

María Gutiérrez-Mecinas¹, José Miguel Blasco-Ibáñez¹, Juan Nàcher¹, Emilio Varea¹, Francisco José Martínez-Guijarro¹ and Carlos Crespo^{1*}.

Institutional affiliation of the authors:

(1) Departamento de Biología Celular, Unidad de Neurobiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia.
Burjasot, E-46100, Spain.

Abbreviated title: Distribution of CNGA3 in the rat OB

Associate Editor: Paul E. Sawchenko

Key words: CNGA3; ensheathing glia; migrating cells; mitral cells; periglomerular cells; olfaction.

***Corresponding author:**

Carlos Crespo

Departamento de Biología Celular. Facultad de Ciencias Biológicas. Street Dr. Moliner, 50.
E-46100. Burjasot. Spain.

Telephone number: +34963543240. Fax number: +34963543404

E-mail: carlos.crespo@uv.es

Grant sponsors: Spanish Ministerio de Educación y Ciencia and Fondo Europeo de Desarrollo Regional: Grant number BFU2007-64130/BFI; Grant number BFU2006-07313/BFI; Grant number BFU2004-00931. Generalitat Valenciana: Grant numbers: GV04A-076; GV04A-134; Grupos 03/119; ACOMP06/093 and ACOMP/2007/169.

ABSTRACT

Previous data suggest that cGMP-signaling can play key roles in the circuitry of the olfactory bulb (OB). Therefore, the expression of cGMP-selective subunits of the cyclic nucleotide-gated ion channels (CNGs) can be expected in this brain region. In the present study, we demonstrate a widespread expression of the cGMP-selective A3 subunit of the CNGs (CNGA3) in the rat OB. CNGA3 appears in principal cells, including mitral cells and internal, medium and external tufted cells. Moreover, it appears in two populations of interneurons, including a subset of periglomerular cells and a group of deep short-axon cells. In addition to neurons, CNGA3-immunoreactivity is found in the ensheathing glia of the olfactory nerve. Finally, an abundant population of CNGA3-containing cells with fusiform morphology and radial processes is found in the inframitral layers. These cells express doublecortin and have a morphology similar to that of the undifferentiated cells that leave the rostral migratory stream and migrate radially through the layers of the OB. Altogether, our results suggest that CNGA3 can play important and different roles in the OB. Channels composed of this subunit can be involved in the processing of the olfactory information taking place in the bulbar circuitry. Moreover, they can be involved in the function of the ensheathing glia and in the radial migration of immature cells through the bulbar layers.

INTRODUCTION

Cyclic nucleotide-gated ion channels (CNGs) are non-selective ion channels, which can be directly activated by cAMP and cGMP (Kaupp and Seifert, 2002; Matulef and Zagotta, 2003). They were first identified in vertebrate rod (Fesenko et al., 1985; Yau and Nakatani, 1985) and cone (Cobbs et al., 1985; Haynes and Yau, 1985) photoreceptors and in olfactory sensory neurons (Nakamura and Gold, 1987), where they participate in sensory transduction (Pifferi et al., 2006 for a review). In these cells, CNGs are present as heterotetramers of distinct subunits (Bradley et al., 2005). To date, six genes coding for six different subunits have been identified in mammals. These subunits are grouped in two families: the A or ‘principal’ subunits and the B or ‘modulatory’ subunits. The A family includes four subunits, which are named CNGA1, CNGA2, CNGA3, CNGA4 and the B family includes two subunits, which are named CNGB1 and CNGB3 (Bradley et al., 2001; Matulef and Zagotta, 2003 for a review).

The subunit composition of the heterotetramers determines the ligand sensitivity, the selectivity and the efficacy of the channel. For example, CNGA1 and CNGA3 subunits are present in the CNGs of rods and cones respectively and these channels sharply discriminate between cGMP and cAMP, being more responsive to the former. On the contrary, CNGA2 subunit is present in the CNGs of the olfactory sensory neurons and these channels respond equally well to cAMP and cGMP (Kaupp and Seifert, 2002). From these data, it can be inferred that CNGA1 and CNGA3 subunits are involved in cGMP-signaling rather than in cAMP-signaling pathways. Supporting this idea, it has been reported that a restricted set of “atypical” olfactory sensory neurons, which do not use the cAMP-signaling for sensory transduction but use cGMP-signaling, do not express CNGA2 but they do express CNGA3 (Meyer et al., 2000).

The olfactory bulb (OB) is the first relay station for olfactory information in the brain. Previous data indicate that cGMP participates as a second messenger in the neural networks of this cerebral area. On the one hand, cGMP acts in nitric oxide-signaling (Stone and Marletta, 1994;

Krumenacker et al., 2004), and OB and cerebellum are the brain regions with the highest production of nitric oxide (Bredt et al., 1991; Vincent and Kimura, 1992). Moreover, we have recently demonstrated an abundant expression of soluble guanylyl cyclase, the most common transducer for nitric oxide-signaling, in the OB (Gutiérrez-Mecinas et al., 2005a). On the other hand, natriuretic peptides and their transducer, particulate guanylyl cyclase, are also abundant in the OB (Bachar et al., 1995; Herman et al., 1996). Altogether, these data suggest that cGMP-signaling may be involved in the bulbar function. Therefore, the expression of cGMP-selective subunits of the CNGs can be expected in the circuitry of the OB.

We set out to test this issue in the present study. For that, we have analyzed the expression of CNGA3 in the OB of the rat using immunocytochemical techniques and light, confocal and electron microscopy. We have found a widespread distribution of CNGA3 in some populations of bulbar neurons, in the ensheathing glia of the olfactory nerve and in immature cells migrating radially through the bulbar layers.

MATERIAL AND METHODS

Animals and tissue preparation

Ten adult male Wistar rats were used for this study. All the procedures were conformed to the guidelines of European Communities Council Directive (86/609/EEC) and conformed to the Spanish legislation for the use and care of animals (Real Decreto 1201/2005). Moreover, they were in accordance with the guidelines of the NIH for the use and care of animals.

The animals were deeply anaesthetised with 4% chloral hydrate in physiological saline (1ml/100g body weight) and intra-aortically perfused, first with saline for 1 minute followed by 500 ml of fixative as follows. Four animals were perfused with 500 ml of 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4, (PB). These animals were used for the analysis of the expression of CNGA3 under the light microscope. Moreover, they were used for the experiments of double-

immunofluorescence. Three additional animals were perfused with 500 ml of 4% (w/v) paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in PB. The three remaining animals were perfused, first, with 50 ml of a mixture of 3.8% (v/v) acrolein and 2% (w/v) paraformaldehyde in PB and, afterwards, with 450 ml of 2% (w/v) paraformaldehyde in PB. Animals perfused with fixatives containing either glutaraldehyde or acrolein were used for electron microscopy. Tissue from animals perfused with fixative containing glutaraldehyde was used for the post-embedding immunogold detection of GABA. The brains of the animals were dissected out after perfusion, and the OBs were cut in 50- μ m-thick coronal sections on a vibratome. Sections were kept in cold PB (4°C) before processing.

Free-floating sections from the animals perfused with the fixatives containing glutaraldehyde or acrolein were treated with 1% NaBH₄ in PB during 30 minutes and extensively rinsed in PB. The sections destined for electron microscopy were cryoprotected 1 hour by immersion in 25% sucrose and 10% glycerol in 0.05 M PB and then freeze-thawed three times with liquid nitrogen to enhance antibody penetration.

Immunocytochemical detection of CNGA3 using the avidin-biotin-immunoperoxidase method for light and electron microscopy

For this method, sections were sequentially incubated in: (i) blocking solution containing 10% normal goat serum (NGS) and 2% bovine serum albumin (BSA) in PB, for 45 minutes at 20°C; (ii) polyclonal rabbit anti-CNGA3 antibody diluted 1:500 in PB containing 1% NGS and 0.8% BSA, for 48 hours at 4°C; (iii) biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Labs.) diluted 1:200 in PB, for 2 hours at 20°C; (iv) avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vector Labs.) diluted 1:200 in PB, for 2 hours at 20°C. The peroxidase reaction was developed using 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma) and 0.003% hydrogen peroxide in PB for 5 minutes at 20°C. Sections were carefully rinsed in PB (3 x 10 minutes) after each step. Following extensive washes in PB, sections were treated with 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy

Science) and 7% glucose in PB for 1 hour at 20°C and then washed repeatedly in PB. Finally, sections were stained with uranyl acetate (Panreac) for 90 minutes at 4°C, dehydrated through graded ethanol series, cleared in propylene oxide (Fluka AG) and flat-embedded in Durcupan (Fluka AG) between slides and coverslips. Durcupan was polymerised overnight at 60°C.

Flat-embedded sections were examined under the light microscope and, after analysis, a few sections containing CNGA3-immunopositive elements from the animals perfused with the fixatives containing either glutaraldehyde or acrolein were re-embedded in Durcupan. Re-embedded material was cut on an ultramicrotome and serial 60-nm-thick ultrathin sections were obtained and mounted on single-slot Formvar-coated nickel grids. The ultrathin sections were directly stained with lead citrate and analysed under the electron microscope or reserved for post-embedding immunogold detection of GABA.

Pre-embedding immunogold-silver detection of CNGA3 for electron microscopy

In this procedure, sections were washed in 0.1 M phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) and sequentially incubated in: (i) blocking solution, containing 0.8% BSA and 0.1% gelatine in PBS for 45 minutes; (ii) polyclonal rabbit anti-CNGA3 receptor serum diluted 1:500 in blocking solution, for 48 hours at 4°C; (iii) 1nm colloidal gold-labeled goat anti-rabbit IgG (Amersham) diluted 1:100 in blocking solution, for 2 hours at 20°C followed for 24 hours at 4°C; (iv) blocking solution (3x5 minutes); (v) and finally 2% glutaraldehyde in PBS for 10 minutes to fix gold particles. After each step, sections were rinsed (3x10 minutes) in PBS. For the microscopic analysis of the staining, the gold particles were enlarged using silver enhancer Aurion R-Gent SE-LM (Electron Microscopy Sciences) for 18 minutes at 20°C. The enhancement was stopped in 0.03M sodium thiosulphate in an enhancement conditioning solution (Aurion) for 10 minutes. Afterwards, the sections were washed in PBS and then treated with 1% osmium tetroxide in PB for 60 minutes at 20°C. Thereafter, the sections were stained with uranyl acetate for 45 minutes at 20°C, dehydrated through increasing graded ethanol series, cleared in propylene oxide and flat-embedded in Durcupan. After analysis of this material under the light microscope, some fields from the sections were re-embedded in Durcupan and 60-nm thick ultrathin sections were cut with an ultramicrotome. Ultrathin sections were serially collected on single-slot Formvar-coated nickel grids and stained with lead citrate before the analysis under the electron microscope.

Colocalization of CNGA3 with CB/CR/PV/TH/nNOS/CCK/DCX

To characterise and identify the CNGA3-immunopositive elements of the OB, we have investigated the colocalization of CNGA3 with different markers: calbindin D-28k (CB), calretinin (CR), parvalbumin (PV), tyrosine hydroxylase (TH), neuronal isoform of the nitric oxide synthase (nNOS), cholecystokinin (CCK) and doublecortin (DCX).

For these experiments, double immunofluorescence was used in sections from the animals perfused with fixative without glutaraldehyde or acrolein. Free-floating sections were incubated in blocking solution containing 10% normal donkey serum (NDS) and 2% BSA in PB, for 45 minutes at 20°C. Then, they were incubated in a mixture of primary antibodies diluted in PB containing 2% NDS and 0.8% BSA, for 48 hours at 4°C. The mixture of primary antibodies was made of polyclonal rabbit anti-CNGA3 (1:500 in the final mixture) and: monoclonal mouse anti-CB (1:10000 in the final mixture), monoclonal mouse anti-CR (1:10000 in the final mixture), monoclonal mouse anti-PV (1:3000 in the final mixture), monoclonal mouse anti-TH (1:1000 in the final mixture), monoclonal mouse anti-nNOS (1:1000 in the final mixture), monoclonal mouse anti-CCK (1:5000 in the final mixture) and polyclonal goat anti-DCX (1:100 in the final mixture). Thereafter, the sections were incubated for 2 hours at 20°C in a mixture of Cy3-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Jackson Labs.; 1:400 in the final mixture) and Cy2-conjugated donkey anti-mouse or donkey anti-goat IgG (Jacksons Labs.; 1:400 in the final mixture). Secondary antibodies were diluted in PB. After each step, sections were carefully washed in PB.

Finally, sections were mounted on gelatine-coated slides and coverslipped with an anti-fading medium (0.42 g glycine, 0.021 g sodium hydroxide, 0.51 g sodium chloride, 0.03 g sodium azide and 5 g N-propyl gallate in 100 ml of 70% glycerine). Double labelling was analysed under Laser Scanning Confocal Microscopy.

Post-embedding immunogold staining for GABA

Pre-embedding immunocytochemical detection of CNGA3 was combined with post-embedding immunogold detection of GABA that was analyzed at the electron microscope. Post-embedding immunostaining for GABA was carried out according to Somogyi and Hodgson (1985), with slight variations as previously reported (Crespo et al., 2000). All steps were carried out on droplets of solution in humid Petri dishes at 20°C as follows: 1% periodic acid (H₅IO₆) for 10 minutes; washing in distilled water (3 x 3 minutes); 2% sodium metaperiodate (NaIO₄) for 10 minutes; washing in distilled water (3 x 3 minutes); washing in 0.05 M Tris-HCl buffer saline (TBS), pH 7.4, for 3 minutes; blocking solution containing 1% chicken egg albumin in TBS for 30 minutes; washing in TBS (2 x 10 minutes); rabbit anti-GABA serum (1:2500 in 1% NGS in TBS) for 2 hours; washing in TBS (2 x 10 minutes); 1% bovine serum albumin and 0.05% Tween 20 in 0.05 M Tris-HCl buffer (TB), pH 7.4, for 10 minutes; goat anti-rabbit IgG-coated 10 nm colloidal gold (Sigma, 1:15 in TB containing 1% bovine serum albumin and 0.05% Tween 20) for 2 hours; washing in distilled water (3 x 5 minutes) and PBS (4 x 5 minutes); 2% glutaraldehyde in PBS for 2 minutes; washing in distilled water (4 x 5 minutes); silver enhancement of the gold particles for 1 minute; washing in distilled water (4 x 5 minutes); saturated uranyl acetate for 30 minutes; washing in distilled water (4 x 5 minutes); staining with lead citrate; washing in distilled water and then dried out.

Profiles showing a density of colloidal gold particles 3-fold higher than background in two or three adjacent sections were considered GABA-immunoreactive. Profiles of olfactory nerve terminals or mitral/tufted cells (presumed to be glutamatergic elements) were used to establish background density.

Antibodies

For the detection of CNGA3, a commercial polyclonal antiserum raised in rabbit by Alomone (#APC-060) has been used. We have recently used this antibody in the rat brain (Gutiérrez-Mecinas

et al., 2007). This antiserum was raised against a peptide corresponding to amino acid residues 594-611 of rat CNGA3. The putative location of the epitope is the intracellular C-terminus of the rat CNGA3 subunit. The company of origin tested the specificity for the antiserum in rat by Western blotting; they also confirmed the absence of bands when the antibody was preincubated with the peptide antigen. Finally, we have further checked the specificity of the CNGA3 antibody by immunocytochemistry. For that, some cryostat sections from retina were processed for the immunocytochemical detection of CNGA3 using the avidin-biotin-immunoperoxidase method as described above. A specific DAB precipitate was obtained in the cone outer segments whereas the rod outer segments were unstained in these sections (Fig 1A), confirming the validity of the immunostaining. Additional controls for the immunocytochemical procedures using the avidin-biotin-immunoperoxidase and the immunogold-silver methods were carried out in our laboratory by omitting the first or second antibodies in each step and by incubating some sections exclusively in blocking solution, in DAB solution or in silver enhancer solution.

The experiments of double immunofluorescence were made using commercial monoclonal antibodies from Swant (CB #300; CR #6B3; and PV #235), Chemicon (TH #MAB318) and Sigma (nNOS #N2280) or a polyclonal antibody from Santa Cruz (DCX #SC8066). The company of origin tested the specificity of these antibodies in rat tissue. Moreover, they have been widely used in previous studies of the rat brain (Gutiérrez-Mecinas et al., 2005a, b, c; Nacher et al., 2005). The antibody against CCK was provided by CURE/Digestive Diseases Research Center, Antibody/RIA Core, University of California, Los Angeles. It has also been previously used in rat brain (Gutiérrez-Mecinas et al., 2005c). Additional controls for the procedure were performed in our laboratory as previously described (Gutiérrez-Mecinas et al., 2005c).

For the post-embedding immunogold detection of GABA, a commercial polyclonal antiserum raised in rabbit has been used (Sigma, #A2052). This antibody has been developed using GABA-BSA as the immunogen. The company of origin tested its specificity: the antibody shows positive binding for GABA in a dot blot assay and negative binding for BSA. This antiserum has been

previously used in post-embedding immunogold detection of GABA (Crespo et al., 2000; Gutiérrez-Mecinas et al., 2005b, c). Controls for the immunocytochemical procedure were carried out as previously described (Crespo et al., 2000).

RESULTS

Strong staining was found in the rat OB after CNGA3-immunocytochemistry. The staining was intense in the olfactory nerve layer (ONL), external plexiform layer (EPL) and mitral cell layer (MCL), although the presence of CNGA3-containing elements was evident in all bulbar layers (Fig. 1B).

Olfactory nerve layer

Dense bundles of ‘fiber-like’ positive elements were found in the ONL. These elements were homogeneously distributed throughout the entire layer and disappeared in the limit with the glomerular layer (GL), just where the olfactory axons innervate the neuropil of the olfactory glomeruli (Fig. 2A, B). Electron microscopy allowed us to identify the positive elements as the processes of the ensheathing glia that wrap the bundles of olfactory axons. However, all the olfactory axons analyzed were clearly negative (Fig. 2C-F).

Glomerular layer

In the glomerular layer, CNGA3-containing elements were found in the periglomerular region and in the neuropil of the olfactory glomeruli (Fig. 3A). In the periglomerular region, these elements corresponded to periglomerular cells and external tufted cells (Fig. 3B-D). Periglomerular cells showed small (5-9 μm) somata with round morphology and a thin dendrite that innervate the glomerular neuropil. External tufted cells were larger than periglomerular cells (10-15 μm), showed

ovoid somata and one or two thick dendrites innervating the glomerular neuropil or running throughout the periglomerular region, close to the boundary with the EPL.

The profiles found in the neuropil of the olfactory glomeruli (Fig. 3A) were analyzed under the electron microscope, using some ultrathin sections stained with DAB-precipitate and some others with gold-silver particles. Ultrastructural analysis indicated that the positive profiles were distributed in both, the sensory and the synaptic compartments of the glomerular neuropil. The positive profiles frequently received asymmetrical synapses from the terminals of the olfactory axons in the sensory compartment. The DAB-precipitate and the gold-silver particles were found in the cytoplasm of the profiles or attached to the plasmatic membrane (Figs. 4 and 5). When the staining was found in the plasmatic membrane of the profiles, there was not a clear link with the synaptic contacts that these profiles made or received.

The positive profiles were unequivocally identified as dendrites of principal cells and dendrites of periglomerular cells on the basis of their synaptology. The positive dendrites of principal cells were distinguished because they made asymmetrical synaptic contacts on periglomerular cells (Fig. 4A-D) and received symmetrical contacts from them. Post-embedding immunogold detection of GABA in material previously stained for CNGA3 with DAB demonstrated the absence of colloidal gold in the profiles corresponding to principal cells (Fig. 4D). The positive dendrites of periglomerular cells were distinguished because they received asymmetrical synapses from principal cells or made symmetrical synapses on them (Fig. 5A, B). Part of the positive dendrites of the periglomerular cells was found in the sensory compartment of the glomerular neuropil, where they occasionally received asymmetrical synapses from the olfactory axons (Fig. 5A). These profiles were GABAergic (Fig. 5C, D). They were also found in the synaptic compartment of the glomerulus. In this compartment, we have found both, GABA-positive and GABA-negative profiles corresponding to dendrites of periglomerular cells.

We have made a further neurochemical analysis of the CNGA3-positive periglomerular cells using double-immunofluorescence and different markers for specific subpopulations of these

interneurons. These markers included the enzymes nNOS and TH, the neuropeptide CCK, and the calcium-binding proteins CB and CR (Fig. 10A-E). CNGA3 did not colocalize with nNOS or TH (both markers stain subpopulations of GABAergic periglomerular cells). Similarly, CNGA3 did not colocalize with CCK or CR (these two markers stain subpopulations of GABA-immunonegative periglomerular cells). Colocalization of CNGA3 and CB was found in a restricted subset of periglomerular cells. These cells represent 17% of the total population of CNGA3-positive periglomerular cells (n=201) and, in turn, 5% of the total population of CB-positive ones (n=646).

External plexiform layer and mitral cell layer

Principal cells of the OB (mitral cells and external, middle and internal tufted cells) were CNGA3-positive (Fig. 6). The staining was intense in the principal and lateral dendrites of these neurons, which results in an intense labeling of the whole EPL. This labeling was not homogeneous throughout the EPL; it was more intense in its outer portion, where the density of dendrites from the external and middle tufted cells is higher (Fig. 6A). In addition to the staining in the dendrites, the principal cells showed immunoreactivity in the cell bodies and in the initial portion of the axons (Fig. 6B-D).

The EPL not only contains principal cells, but also an abundant population of GABAergic interneurons that express the calcium-binding protein PV (Kosaka et al., 1994). These interneurons were apparently CNGA3-negative under the light microscope in sections stained with DAB. However, the intense staining for CNGA3 in the EPL, due to the principal cells, could be masking the staining of the interneurons. To confirm the absence of CNGA3 in the interneurons of the EPL, CNGA3/PV double immunofluorescence was performed. This experiment demonstrated that CNGA3 was not present in the somata and dendritic branches of the PV-containing interneurons of this layer (Fig. 10F).

It was clear that at least part of the staining found in the neuropil of the EPL corresponded to the large dendritic profiles of the principal cells. However, an interesting point in our study was to

investigate whether other elements of the neuropil of this layer were positive. The neuropil of the EPL is composed of dendrites of principal cells, branches and gemmules of the apical dendrites of granule cells and processes of the GABAergic interneurons of this layer. Although it was easy to distinguish the large positive profiles of principal cells in the EPL, it was not possible in our material to differentiate small profiles such as gemmules and varicosities of granule cells and interneurons of the EPL under the light microscope. Therefore, we have analyzed the neuropil of the EPL under the electron microscope. Ultrastructural analysis, allowed to unequivocally identify the profiles of granule cells and interneurons of the EPL on the basis of their morphology and synaptic relationships with principal cells. In this regard, the gemmules and varicosities of granule cells and interneurons of the EPL make symmetrical synapses on principal cells. In turn, they receive asymmetrical synapses from principal cells. Moreover, the varicosities of the interneurons of the EPL can be distinguished under the electron microscope from the gemmules of the granule cells, because the former are larger in size and contain abundant mitochondria. Ultrastructural analysis confirmed that the dendrites of the principal cells contained CNGA3 and also indicated that the gemmules and varicosities of granule cells and interneurons of the EPL were negative (Fig. 7A). These data were further confirmed combining pre-embedding staining for CNGA3 using DAB precipitate as chromogen and post-embedding immunogold staining for GABA. Since the profiles of granule cells and interneurons of the EPL are GABAergic, they were easily identified in this material by the presence of colloidal gold. We have found that GABA-containing profiles in the EPL do not contain CNGA3 (Fig. 7B, C).

Inframitral layers

The inframitral layers include the internal plexiform layer (IPL), the granule cell layer (GCL) and the white matter (WM). CNGA3-positive cells were abundant in this region (Fig. 8A). These cells could be included in two different groups. The first was composed of large neurons (12-18 μm) with pyriform or polygonal morphology, identified as deep short-axon cells (Fig. 8B-F). They

were located at different levels throughout the entire inframitral region, from the IPL to the WM. The pyriform cells were mainly located in the IPL and superficial portion of the GCL. They showed an apical dendrite that was directed towards the EPL. The polygonal cells were found at different levels of the GCL and had two or more dendrites, which were only stained in their proximal portions.

The second group of cells found in the inframitral region was clearly distinguishable from the deep short-axon cells previously described, and it was composed of fusiform cells that were more abundant in the deepest portion of the GCL and in the WM (Fig. 9A). These cells showed medium-sized somata (8-13 μm in the long axis) with one or two radial processes oriented perpendicular to the bulbar layers (Fig. 9 B-F). These processes were not profusely ramified and showed only few short branches (Fig. 9 E-F). The morphology of these cells is different from that of granule cells. In fact, granule cells were apparently CNGA3-immunonegative. To confirm this result, we have performed double immunofluorescence combining CNGA3 with two markers for granule cells: the enzyme nNOS and the calcium-binding protein CR. This experiment confirmed that the CNGA3-containing fusiform cells found in the inframitral regions do not contain the granule cell markers. Moreover, the nNOS-positive and the CR-positive granule cells did not contain CNGA3 (Fig. 10G, H).

We have recently described that CNGA3 is expressed in the migrating neuroblasts of the rostral migratory stream (Gutiérrez-Mecinas et al., 2007). The CNGA3-containing fusiform cells found in the inframitral region were more abundant in its deep portion, mainly in the proximity of the rostral migratory stream (Fig. 9A), and were morphologically similar to immature cells. Therefore, we suspected that they might be immature cells, which came from the rostral migratory stream and were radially migrating through the bulbar layers. To check this hypothesis, we have performed double immunofluorescence combining antibodies against CNGA3 and DCX, a microtubule associated protein which is involved in cell migration. This experiment clearly

demonstrated that the CNGA3-containing fusiform cells found in the inframitral region were DCX-positive (Fig. 10I), and therefore, immature radially migrating cells.

DISCUSSION

The main result of our report is the widespread distribution of CNGA3 immunoreactivity in the rat OB, suggesting that the CNGs composed of this subunit are important in the function of this brain area. The diverse cell types that express CNGA3, including mature neurons (principal cells, and restricted subpopulations of interneurons), immature radially migrating cells and a specific type of glial cells, account for the diverse functions in which CNGA3 may be involved.

Expression of CNGA3 in the ensheathing glia

An interesting finding of the present study is the expression of CNGA3 in the ensheathing glia. Olfactory ensheathing glia constitute a type of glia that shares some common features with astrocytes and Schwann cells, although it has a different origin and shows peculiar structural features (Ramón-Cueto and Ávila, 1998 for a review). These cells enfold olfactory axons avoiding them to contact other glial cells and it is known that they underlie the capacity of axonal growth and functional regeneration shown by the olfactory sensory neurons. For this reason, attention has been paid to the cellular and molecular biology of the ensheathing glial cells (Chuah and West, 2002). Numerous studies have analyzed the phenotypic pattern of these cells with the purpose of obtaining specific chemical markers to identify them *in vivo* and *in vitro* (Ramón-Cueto and Ávila, 1998; Chuah and West, 2002 for a review). The conclusion from these studies is that ensheathing glia shares common immunocytochemical markers with other types of glia, although their antigenic patterns do not completely match. Here, we have demonstrated that the olfactory ensheathing glial cells show a strong CNGA3-immunoreactivity. Therefore, CNGA3 may be used as a tool for the

chemical identification of this type of glia. We still do not know whether other types of glia show CNGA3-immunoreactivity. In our material, we have not found positive astrocytes under the light and electron microscopes. In a similar way, we have not found positive oligodendrocytes in the white matter. However, more detailed studies using CNGA3 and specific markers for astrocytes, oligodendrocytes, Schwann cells and microglia are needed in order to determine whether CNGA3 expression is specific for ensheathing glia or is a chemical feature shared with other types of glia.

Ensheathing glia shows a relatively high and variable intracellular concentration of calcium at resting (Hayat et al., 2003a). Calcium homeostasis is decisive for the correct working of these cells. In this regard, the effectiveness of ensheathing glial cells in promoting axonal regeneration depends of their intracellular concentration of calcium (Hayat et al., 2003a, b). In their reports, these authors anticipated that ensheathing glial cells should have a calcium influx pathway mediated by non-voltage-gated cation channels, which should be tonically active leading to a high intracellular concentration of the cation. However, they do not identify these channels. Interestingly, our results provide the anatomical basis to explain the data by Hayat et al. (2003a, b). On the one hand, the CNGs are non-voltage-gated channels. On the other hand, the CNGs are permeable to divalent cations, in particular calcium, providing an effective pathway for the entrance of this cation into the cell. We hypothesize that, in addition to the function that CNGA3 plays in the transduction of the visual information in the cones of the retina, channels containing this subunit may allow the entrance of calcium in the olfactory ensheathing glial cells, leading to the correct activity of this type of glia. Our results can constitute a basis to investigate the molecular machinery underlying the role that ensheathing glia plays in axonal growth and guidance.

Expression of CNGA3 in neurons of the OB circuitry

All CNGs respond to some extent to cAMP and cGMP. It is well known that transduction of odorant information in the olfactory sensory neurons involves cAMP-signaling and channels

composed of CNGA2, CNGA4 and CNGB1 subunits (Nakamura and Gold, 1987; Bradley et al., 2005; Pifferi et al., 2006). It has been demonstrated that these channels do not discriminate between cAMP and cGMP. On the contrary, transduction of visual information in the cones involves cGMP-signaling and channels composed of CNGA3 and CNGB3 subunits. These channels clearly discriminate between cGMP and cAMP. Interestingly, there is a restricted set of sensory neurons in the rat olfactory epithelium that do not use cAMP-signaling for sensory transduction but use cGMP-signaling. They do not express CNGA2 in their apical cilia but express CNGA3 (Meyer et al., 2000). Altogether, these data indicate that CNGA3 can be considered a cGMP-selective subunit of the CNGs and, therefore, the widespread distribution of CNGA3 in the circuitry of the OB suggests a key role for cGMP-signaling in the processing of olfactory information. We will discuss this role and the involvement of CNGs.

It has been reported that the cyclic nucleotides cAMP and cGMP can facilitate synaptic transmission between olfactory nerve fibers and their targets in the olfactory glomeruli (Murphy and Isaacson, 2003). Using electrophysiological paradigms, these authors conclude that this role is mediated by CNGs located in the presynaptic terminals of the olfactory axons: CNGs would increase the concentration of calcium in the synaptic boutons, leading to an increase of the transmitter release. We have not found CNGA3-immunoreactivity in the axons of the olfactory nerve layer. Moreover, we have analyzed the synaptic terminals of the olfactory axons in the sensory compartment of the glomerular neuropil and they were clearly CNGA3-negative. Therefore, our present data show that CNGA3 subunit is not involved in the presynaptic effects described by Murphy and Isaacson (2003). Channels composed of other subunits, such as CNGA2, could participate in this role. In fact, it has been reported that CNGA2 is present not only in the cilia of the olfactory sensory neurons, but also in their axons (Matsuzaki et al., 1999), where they may modulate the synaptic transmission described by Murphy and Isaacson.

The most abundant population of CNGA3-containing cells found in the OB is composed of glutamatergic principal cells, including mitral cells, and external, middle and internal tufted cells.

Moreover, we have found CNGA3-immunoreactivity in two populations of GABAergic interneurons: periglomerular cells and deep short-axon cells. Our report is not the first study indicating the expression of CNGA3 in cells other than retinal cones. A previous report, using *in situ* hybridization techniques, indicates the presence of CNGA3 mRNA in cells of the rat visual cortex (Samanta Roy and Barnstable, 1999), although the role that it can play in these cells is not presently understood. In the same way, we do not know the role that CNGA3 can play in the bulbar neurons. It has been demonstrated that cGMP may modulate cortical glutamatergic and GABAergic synapses at presynaptic terminals, but this role involves cGMP-dependent protein kinase (PKG) rather than CNGs (Barnstable et al., 2004 for a review). We have found CNGA3 at presynaptic sites in both principal cells and interneurons, and, therefore, we cannot discard a presynaptic effect on these elements of the circuitry. Electrophysiology should give an insight into the function of CNGA3 in the bulbar neurons.

It has been suggested that the activity of the CNGs in the neurons might be coupled to nitric oxide signaling. Moreover, the correlation between the spatial expression of CNGs and elements of the nitric oxide signaling in some neurons has led some authors to propose that CNGs might be one of the major effectors of the nitric oxide signaling system (Barnstable et al., 2004). The OB is one of the brain regions with the highest production of nitric oxide (Bredt et al., 1991; Vincent and Kimura, 1992). However, our present results indicate that CNGA3 is not linked to the nitric oxide signaling system in the circuitry of the rat OB. Two facts support this assumption. First, it is widely accepted that, in physiological conditions, nitric oxide activates the enzyme soluble guanylyl cyclase. The bulbar principal cells are the most abundant population of bulbar neurons expressing CNGA3, but we have previously demonstrated that they do not contain the $\beta 1$ subunit of the soluble guanylyl cyclase (Gutierrez-Mecinas et al., 2005a) and therefore they cannot respond to nitric oxide producing cGMP. Second, the most abundant population of neurons containing soluble guanylyl cyclase in the rat OB is the population of CB-containing periglomerular cells (Gutierrez-Mecinas et al., 2005a). Nevertheless, our present results reveal that only 5% of the CB-containing

periglomerular cells express CNGA3. Therefore, the major source of cGMP in the CNGA3-containing neurons of the rat OB does not appear to be the nitric oxide signaling system. We suppose that the expression of CNGA3 in the bulbar neurons is linked to the natriuretic peptide signaling system. Natriuretic peptides activate a particulate guanylyl cyclase switching the production of cGMP. Interestingly, a previous report demonstrated the presence of particulate guanylyl cyclase mRNA in the principal cells of the OB (Herman et al., 1996) and we have demonstrated that these neurons contain CNGA3.

Expression of CNGA3 in immature migrating cells

In addition to the expression of CNGA3 in the ensheathing glia and in some populations of bulbar neurons, we demonstrate the expression of this subunit in fusiform cells whose morphology does not match with that of the mature bulbar neurons. These cells are abundant in the granule cell layer, but they do not express markers of rat granule cells such as nNOS and CR. They express DCX, which is a protein required for neuronal migration that is expressed in radially and tangentially migrating neuroblasts (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999; Náchter et al., 2001). Recently, we have demonstrated that the migrating neuroblasts of the rostral migratory stream express CNGA3 and the expression of this subunit is linked to the nitric oxide signaling system (Gutiérrez-Mecinas et al., 2007). In that report, we propose that CNGs composed of the CNGA3 subunit can constitute an effective transducer for the nitric oxide/cGMP signaling system, allowing for rapid and precise fluctuations of the intracellular calcium, which might influence the tangential migration of the neuroblasts. Now, we demonstrate that the expression of CNGA3 continues in the neuroblasts that leave the rostral migratory stream and initiate the radial migration throughout the bulbar layers. This fact suggest that CNGA3 may also be involved in its radial migration as a transducer for the nitric oxide signaling system.

Conclusion

CNGA3 is widely expressed in the rat OB. Our anatomical data indicate that, in the central nervous system, CNGA3 can be involved in diverse functions other than the sensory transduction in the cones. First, channels composed of CNGA3 could modulate the correct function of the ensheathing glia. Second, they could modulate the synaptic transmission of the bulbar circuits (probably as a response to the natriuretic peptides/particulate guanylyl cyclase/cGMP signaling system). Third, they could influence radial migration of immature cells through the bulbar layers probably as a response to the nitric oxide/soluble guanylyl cyclase/cGMP signaling system.

ACKNOWLEDGEMENTS

María Gutiérrez-Mecinas is a recipient of a FPU fellowship from the Spanish MEC. Mouse antibody raised against CCK was provided by CURE/Digestive Diseases Research Center, Antibody/RIA Core, NIH Grant #DK41301. The Electron Microscopy analysis and the Laser Scanning Confocal Microscopy analysis were made at the SCSIE of the Universidad de Valencia.

LITERATURE CITED

- Bachar C, Haver E, Kadar T, Levy A, Lichtstein D. 1995. Possible involvement of atrial natriuretic peptides in olfaction. *Brain Res* 682:231-234.
- Barnstable CJ, Wei JY, Han MH. 2004. Modulation of synaptic function by cGMP and cGMP-gated cation channels. *Neurochem Int* 45:875-884.
- Bradley J, Frings S, Yau KW, Reed R. 2001. Nomenclature for ion channel subunits. *Science* 294:2095-2096.

- Bradley J, Reisert J, Frings S. 2005. Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Curr Opin Neurobiol* 15:343-349.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. 1991. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7:615-624.
- Chuah MI, West AK. 2002. Cellular and molecular biology of ensheathing cells. *Microsc Res Tech* 58:216-227.
- Cobbs WH, Barkdoll AE, III, Pugh EN, Jr. 1985. Cyclic GMP increases photocurrent and light sensitivity of retinal cones. *Nature* 317:64-66.
- Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Briñón JG, Alonso JR, Domínguez MI, Martínez-Guijarro FJ. 2000. Subcellular localization of m2 muscarinic receptors in GABAergic interneurons of the olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 12:3963-3974.
- Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL. 1985. Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 313:310-313.
- Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J. 1999. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 23:247-256.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. 1999. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23:257-271.
- Gutiérrez-Mecinas M, Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Gracia-Llanes FJ, Marqués-Marí AI, Martínez-Guijarro FJ. 2005a. Soluble guanylyl cyclase appears in a specific subset of periglomerular cells in the olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 21:1443-1448.
- Gutiérrez-Mecinas M, Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Gracia-Llanes FJ, Marqués-Marí AI, Nacher J, Varea E, Martínez-Guijarro FJ. 2005b. Distribution of D2 dopamine receptor in the olfactory glomeruli of the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 22:1357-1367.

- Gutiérrez-Mecinas M, Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Gracia-Llanes FJ, Marqués-Marí AI, Martínez-Guijarro FJ. 2005c. Characterization of somatostatin- and cholecystokinin-immunoreactive periglomerular cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 489:467-479.
- Gutiérrez-Mecinas M, Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Nácher J, Varea E, Martínez-Guijarro FJ. 2007. Migrating neuroblasts of the rostral migratory stream are putative targets for the action of nitric oxide. *Eur J Neurosci* (in press).
- Hayat S, Wigley CB, Robbins J. 2003a. Intracellular calcium handling in rat olfactory ensheathing cells and its role in axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci* 22:259-270.
- Hayat S, Thomas A, Afshar F, Sonigra R, Wigley CB. 2003b. Manipulation of olfactory ensheathing cell signaling mechanisms: effects on their support for neurite regrowth from adult CNS neurons in coculture. *Glia* 44:232-241.
- Haynes L, Yau KW. 1985. Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membrane of catfish cones. *Nature* 317:61-64.
- Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub MC, Jr. 1996. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 369:165-187.
- Kaupp UB, Seifert R. 2002. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82:769-824.
- Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T. 1994. Calcium-binding protein parvabumin-immunoreactive neurons in the rat olfactory bulb. 1. Distribution and structural features in adult rat. *Exp Brain Res* 99:191-204.
- Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F. 2004. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull* 62:505-515.
- Matsuzaki O, Bakin RE, Cai X, Menco BP, Ronnett GV. 1999. Localization of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel subunit 1 in normal, embryonic and regenerating olfactory epithelium. *Neuroscience* 94:131-140.
- Matulef K, Zagotta WN. 2003. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:23-44.

- Meyer MR, Angele A, Kremmer E, Kaupp UB, Muller F. 2000. A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10595-10600.
- Murphy GJ, Isaacson JS. 2003. Presynaptic cyclic nucleotide-gated ion channels modulate neurotransmission in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 37:639-647.
- Nácher J, Crespo C, McEwen BS. 2001. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur J Neurosci* 14:629-644.
- Nácher J, Varea E, Blasco-Ibáñez JM, Castillo-Gómez E, Crespo C, Martínez-Guijarro FJ, McEwen BS. 2005. Expression of the transcription factor Pax 6 in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci Res* 81:753-761.
- Nakamura T, Gold GH. 1987. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325:442-444.
- Pifferi S, Boccaccio A, Menini A. 2006. Cyclic nucleotide-gated ion channels in sensory transduction. *FEBS Lett* 580:2853-2859.
- Ramón-Cueto A, Avila J. 1998. Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res Bull* 46:175-187.
- Samanta Roy DR, Barnstable CJ. 1999. Temporal and spatial pattern of expression of cyclic nucleotide-gated channels in developing rat visual cortex. *Cereb Cortex* 9:340-347.
- Somogyi P, Hodgson AJ. 1985. Antisera to gamma-aminobutyric acid. III. Demonstration of GABA in Golgi-impregnated neurons and in conventional electron microscopic sections of cat striate cortex. *J Histochem Cytochem* 33:249-257.
- Stone JR, Marletta MA. 1994. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33:5636-5640.
- Vincent SR, Kimura H. 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46:755-784.

Yau KW, Nakatani K. 1985. Light-suppressible, cyclic GMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncated rod outer segment. *Nature* 317:252-255.

FIGURE LEGENDS:**FIGURE 1.** CNGA3 in the retina and olfactory bulb.

(A): The antibody against CNGA3 stains specifically the outer segments of the cones (arrows) in the retina.

(B): Panoramic view of the staining for CNGA3 in the rat olfactory bulb. The layers with the most intense staining are the olfactory nerve layer (ONL) and the external plexiform layer (EPL). However, CNGA3-containing elements are abundant in all bulbar layers.

GCL: granule cell layer; GL: glomerular layer; IPL: internal plexiform layer; MCL: mitral cell layer.

Scale bars: 50 μm in (A); 200 μm in (B).

FIGURE 2. CNGA3 staining in the olfactory nerve layer.

(A): In the olfactory nerve layer (ONL), an intense staining was found in dense bundles of 'fiber-like' elements. Note that the staining disappears in the boundary with the glomerular layer (GL).

(B): The CNGA3-containing 'fiber like' elements do not enter within the olfactory glomeruli (g) (arrow).

(C) and (D): Electron microscopy demonstrates that CNGA3 staining is located in the processes of the ensheathing glia (arrows). The axons of the olfactory nerve (Ax) are negative.

(E): Occasionally, the positive cell body of an ensheathing glial cell (asterisk) was found in the ONL.

(F): The positive processes of the ensheathing glia (arrows) can be perfectly distinguished from the bundles of negative olfactory axons (Ax) in a longitudinal section.

Scale bars: 100 μm in (A); 50 μm in (B); 0.5 μm in (C) and (D); 1 μm in (E) and (F).

FIGURE 3. CNGA3 staining in the glomerular layer under the light microscope.

(A): CNGA3 appears in some neurons (arrows) located in the periglomerular region of an olfactory glomerulus (g).

(B): CNGA3-positive periglomerular cells (arrows) can be distinguished among the thick dendrites of the positive principal cells.

(C) and (D): In addition to the stained periglomerular cells (solid arrows), there are CNGA3-containing external tufted cells in the periglomerular region of the olfactory glomeruli (open arrows). Note that the positive periglomerular cells and the positive external tufted cells are perfectly distinguishable by their size and morphological features.

Scale bars: 25 μm in (A) and (B); 12.5 μm in (C) and (D).

FIGURE 4. CNGA3 staining in the glomerular neuropil under the electron microscope.

(A) and (B): Two positive dendrites of mitral/tufted cells (M/T) make asymmetrical synaptic contacts (arrows) on two negative dendrites of periglomerular cells (PG) in the synaptic compartment of the glomerular neuropil.

(C): Pre-embedding immunogold detection of CNGA3 shows a positive dendrite of a M/T establishing a synapse (arrow) with the dendrite of a negative PG. Note that there is no specific subcellular localization of the gold-silver particles in the positive dendrite. They are indistinctly found linked to the plasmatic membrane or in the cytoplasm of the dendrite.

(D): Post-embedding immunogold detection of GABA in sections previously stained for CNGA3 with DAB as chromogen. A CNGA3-positive and GABA-negative dendrite of a M/T make an asymmetrical synapse (arrow) on a GABA-positive and CNGA3-negative PG.

Scale bars: 250 nm in (A), (B) and (D); 0.5 μm in (C).

FIGURE 5. CNGA3 staining in the glomerular neuropil under the electron microscope.

(A): The positive dendrite of a periglomerular cell (PG) receives an asymmetrical synapse from a mitral/tufted cell (M/T) and another from the olfactory nerve (ON) (open arrows) in the sensory

compartment of the glomerular neuropil. Note that DAB precipitate is linked to the plasmatic membrane of the PG (solid arrow).

(B): Pre-embedding immunogold detection of CNGA3 shows the positive dendrite of a M/T making a synapse (open arrow) on the positive dendrite of a PG. In the PG, note that gold-silver particles are attached to the plasmatic membrane (solid arrows).

(C) and (D): Post-embedding immunogold detection of GABA in sections previously stained for CNGA3 using DAB as chromogen. Two CNGA3- and GABA-positive PG are located in the sensory compartment of the glomerular neuropil. Open arrows point out an asymmetrical synapse from the ON to the PG in (C) and a symmetrical synapse from the PG to a M/T in (D). Solid arrows point out the DAB precipitate in the PG profiles.

Scale bars: 0.5 μm .

FIGURE 6. CNGA3-staining in the external plexiform layer and in the mitral cell layer under the light microscope.

(A): Semi-panoramic view showing that CNGA3-staining is intense in the whole external plexiform layer, due to the dendrites of principal cells. The density of positive elements is higher in the external portion of the layer (EPL ex.) compared to the internal portion (EPL in.). The dendrite of a positive mitral cell can be followed across the layer (arrows).

(B): Positive external tufted cells located in the EPL ex.

(C): Positive middle tufted cell in the EPL in.

(D): Positive mitral cells in the mitral cell layer. Note that the initial portion of the axons are also stained in the internal plexiform layer (arrows).

Scale bars: 100 μm in (A); 25 μm in (B), (C) and (D).

FIGURE 7. CNGA3 in the neuropil of the external plexiform layer under the electron microscope.

(A): Pre-embedding immunogold detection of CNGA3. Gold-silver particles are found in the dendrites of the mitral/tufted cells (M/T). The gemmules of the granule cells (Gr), which are establishing synaptic relationships with the M/T (open arrows) are clearly negative.

(B) and (C): Post-embedding immunogold detection of GABA in sections previously stained for CNGA3 using DAB as chromogen. Two GABAergic gemmules of Gr are CNGA3-negative in (B). These gemmules receive asymmetrical synapses from a CNGA3-positive M/T (arrows). The varicosity of a GABAergic interneuron of the external plexiform layer (In) is CNGA3-negative in (C). This varicosity receive an asymmetrical synapse from a CNGA3-positive M/T (arrow).

Scale bars: 0.5 μm .

FIGURE 8. CNGA3 in deep short-axon cells of the inframitral layers.

(A): Semi-panoramic view of the internal plexiform layer (IPL) and granule cell layer (GCL). The density of positive cells is high in the inframitral region.

(B): Two positive deep short-axon cells are located in the IPL (solid arrows). They are smaller than a positive mitral cell (open arrow).

(C): Three positive deep short-axon cells (open arrows) are located in the superficial portion of the GCL. These cells are morphologically distinguishable from the positive fusiform cell (solid arrow) located in the same region.

(D-F): Detailed views of three CNGA3-containing deep short-axon cells of the GCL with pyriform or polygonal morphologies at different levels of the IPL and GCL.

EPL: external plexiform layer; MCL: mitral cell layer.

Scale bars: 50 μm in (A); 25 μm in (B) and (C); 12.5 μm in (D), (E) and (F).

FIGURE 9. CNGA3 in fusiform cells of the inframitral layers.

(A): Semi-panoramic view of the inframitral region showing positive fusiform cells. The density of these cells is higher in the deep portion of the granule cell layer (GCL) and in the white matter

(WM). Note that the rostral migratory stream (RMS) also contains an abundant population of positive cells.

(B): The positive fusiform cells (solid arrows) are morphologically distinguishable from the positive deep short-axon cells (open arrow) found in the same region.

(C) and (D): One or two radial processes oriented perpendicularly to the bulbar layers can be found in the positive fusiform cells.

(E) and (F): The processes are not profusely ramified. On the contrary, only short branches can be occasionally observed in the processes of these cells (arrows).

Scale bars: 100 μm in (A); 12.5 μm in (B), (C), (D), (E) and (F).

FIGURE 10. Neurochemical characterization of the CNGA3-positive cells. Red fluorophore was used to stain CNGA3 and green fluorophore was used to stain the other markers.

(A): CNGA3 do not colocalize with nNOS in periglomerular cells.

(B): The CNGA3-containing periglomerular cells do not contain TH.

(C): CNGA3 and CCK colocalize in some tufted cells. However, they do not colocalize in periglomerular cells. Solid arrows point to CNGA3-containing periglomerular cells and open arrow point to a CCK-containing periglomerular cell.

(D): The CNGA3-containing periglomerular cells shown do not contain CB.

(E): CNGA3-positive periglomerular cells are CR-negative.

(F): CNGA3 is not expressed in the PV-containing interneurons of the external plexiform layer.

(G): The CNGA3-containing fusiform cells found in the inframitral region are not nNOS-containing granule cells.

(H): The CR-containing granule cells do not contain CNGA3.

(I): The CNGA3-positive fusiform cells found in the inframitral region are DCX-positive.

Scale bar: 50 μm .

Distribution of CNGA3 in the rat OB
Gutiérrez-Mecinas et al.

-29-

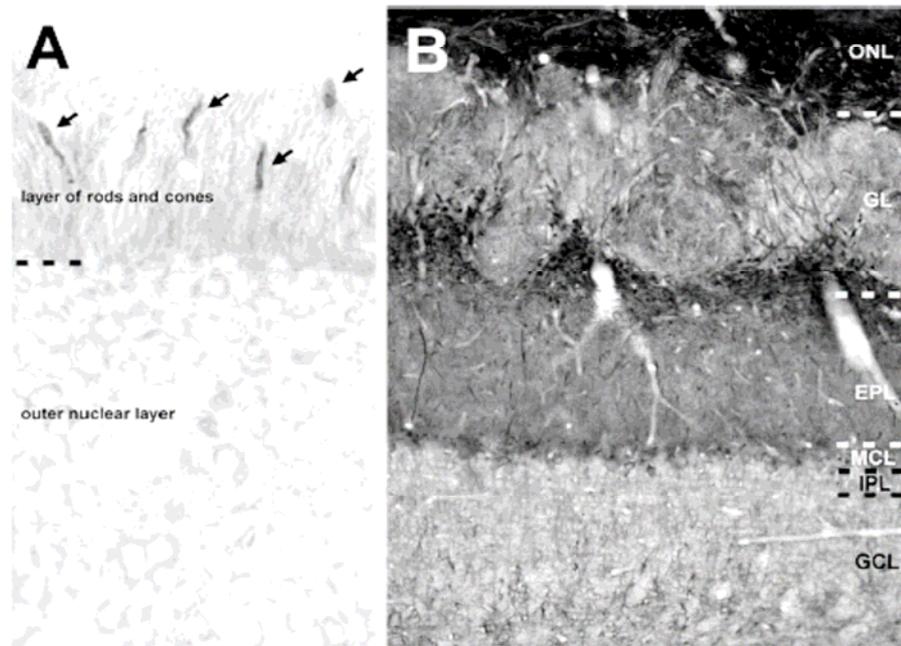


Figure 1

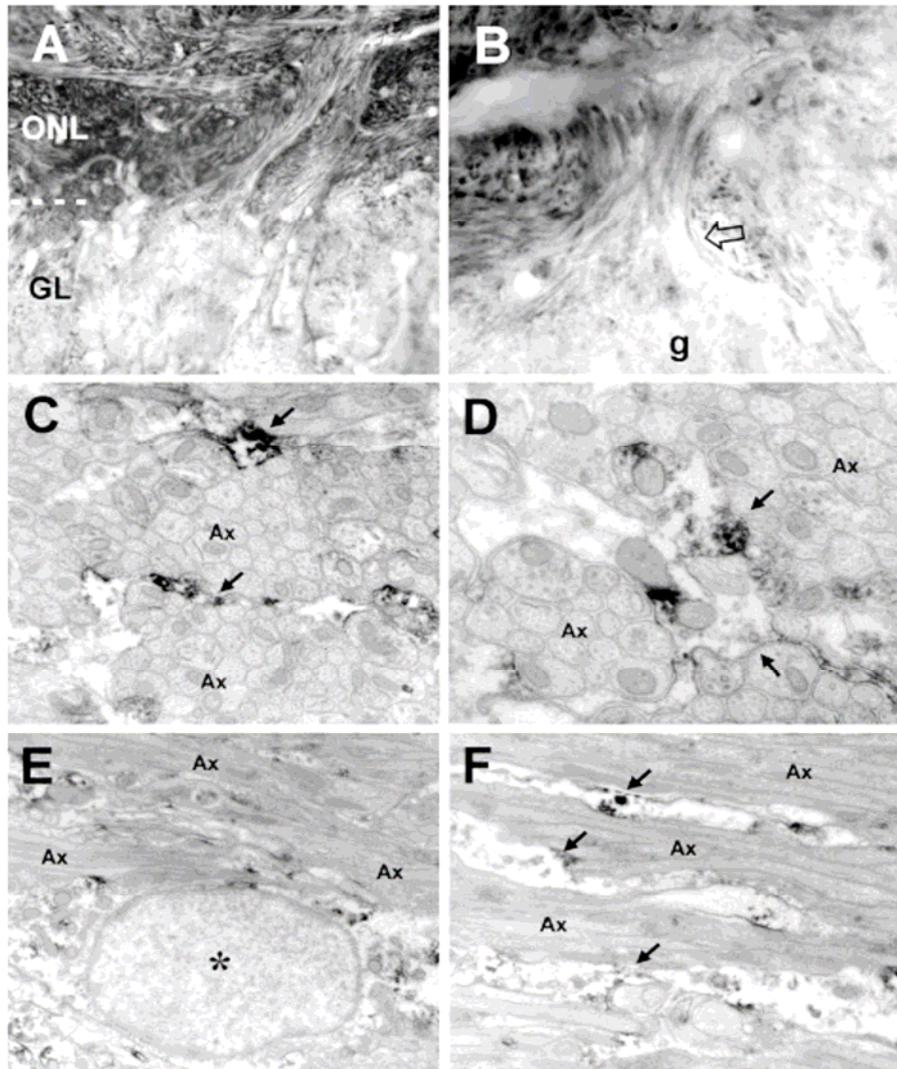


Figure 2

Distribution of CNGA3 in the rat OB
Gutiérrez-Mecinas et al.

-31-

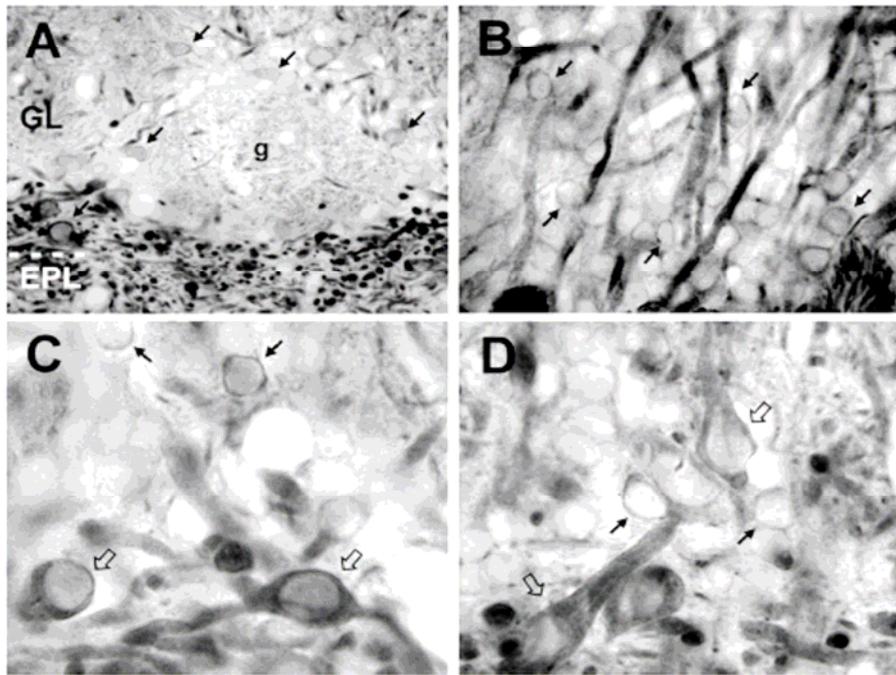


Figure 3

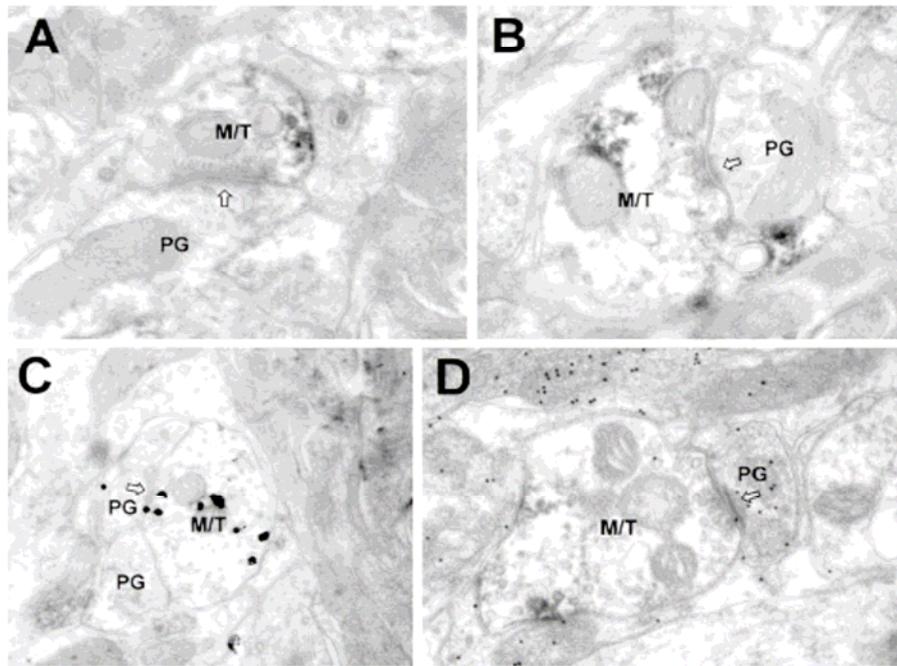


Figure 4

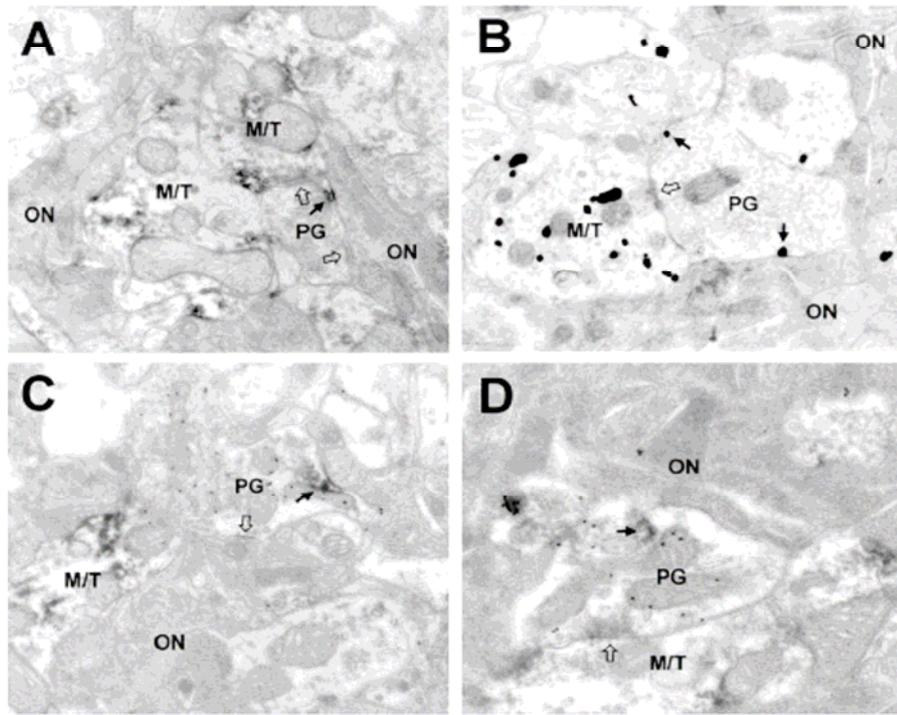


Figure 5

Distribution of CNGA3 in the rat OB
Gutiérrez-Mecinas et al.

-34-

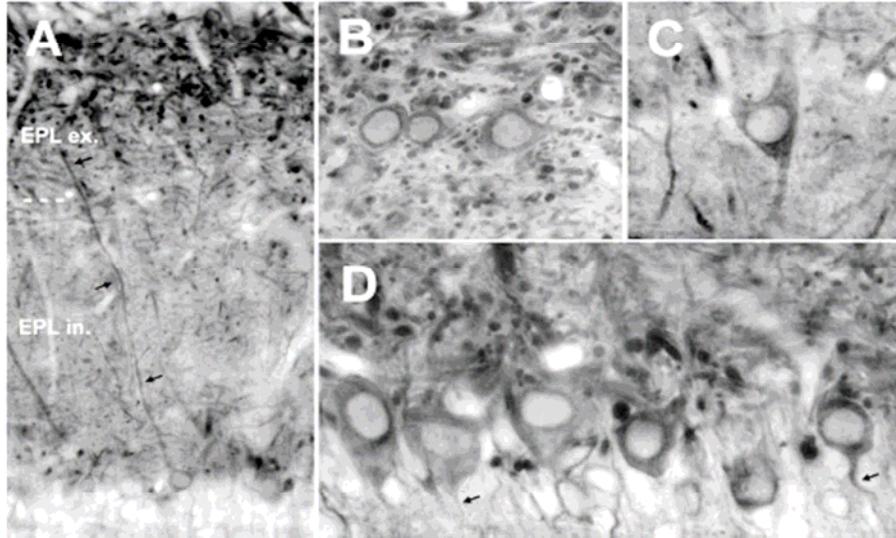


Figure 6

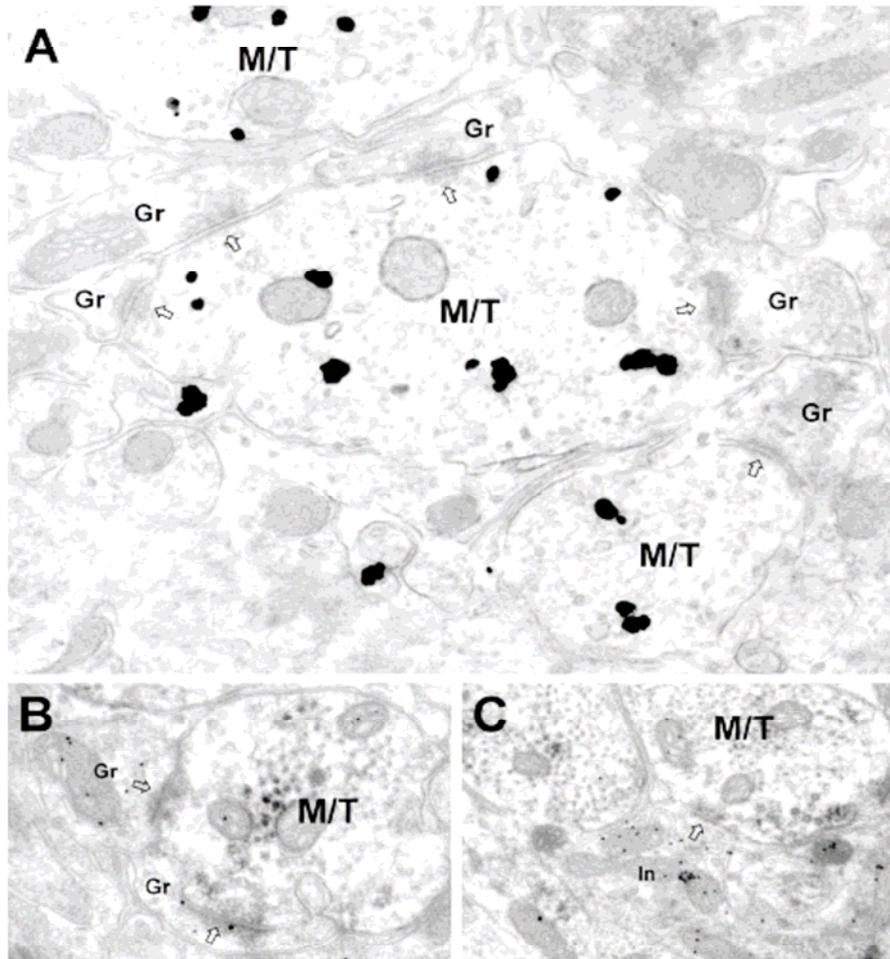


Figure 7

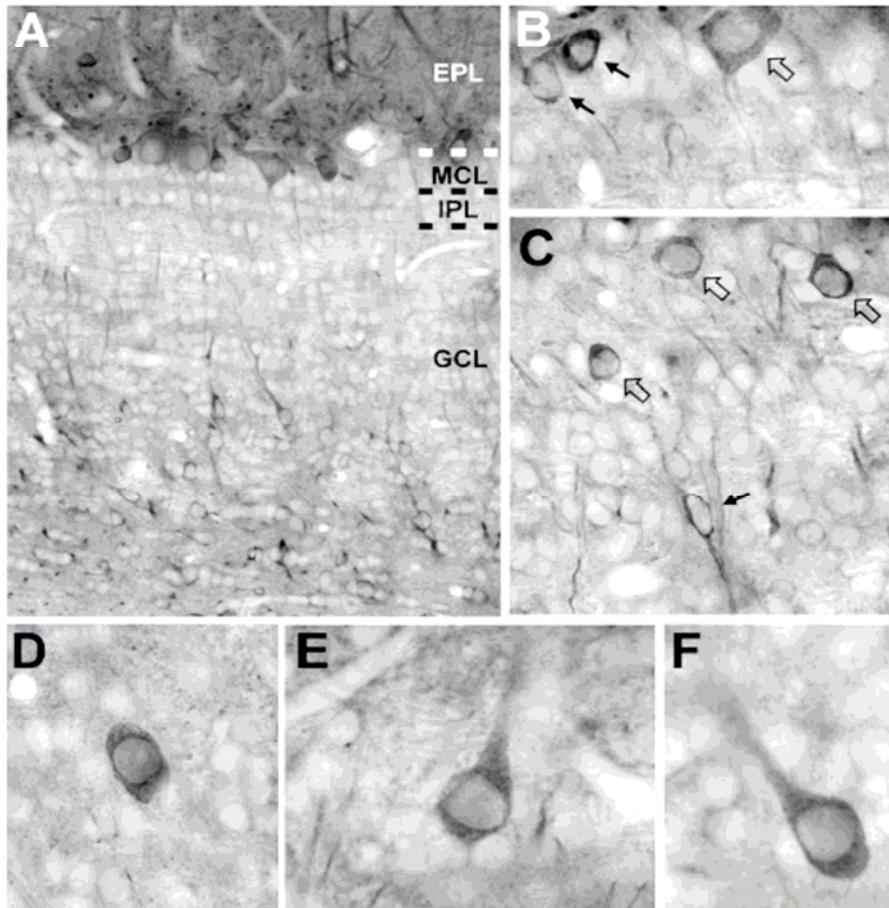


Figure 8

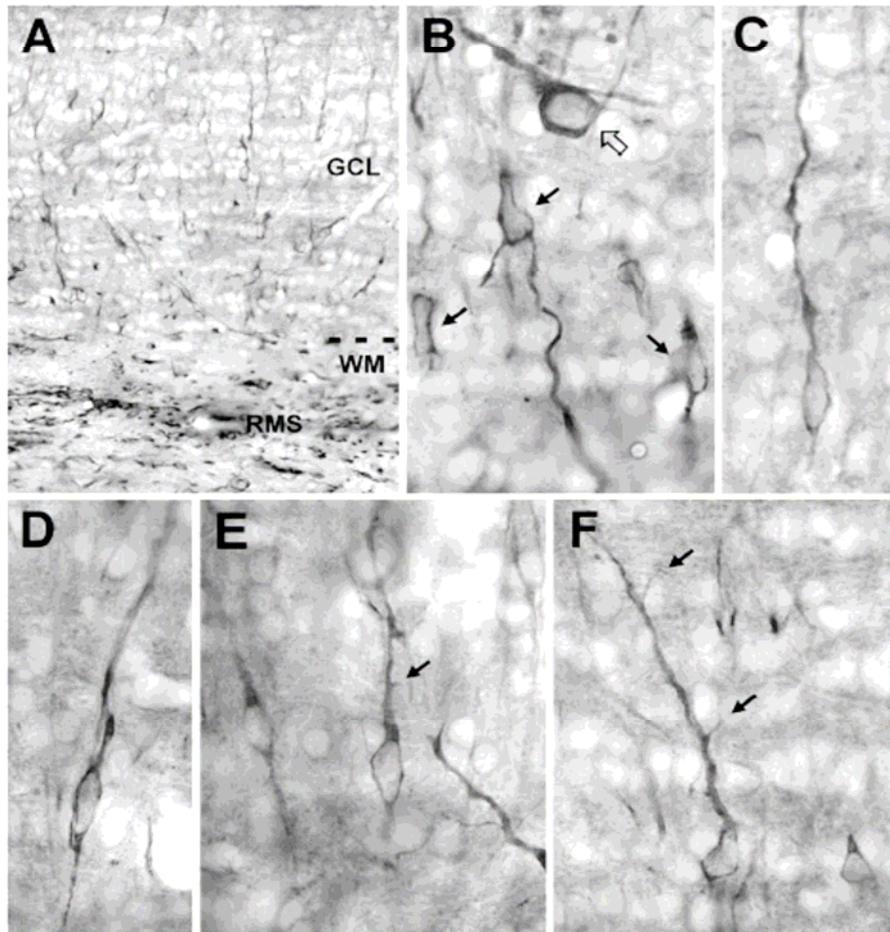


Figure 9

Distribution of CNGA3 in the rat OB
Gutiérrez-Mecinas et al.

-38-

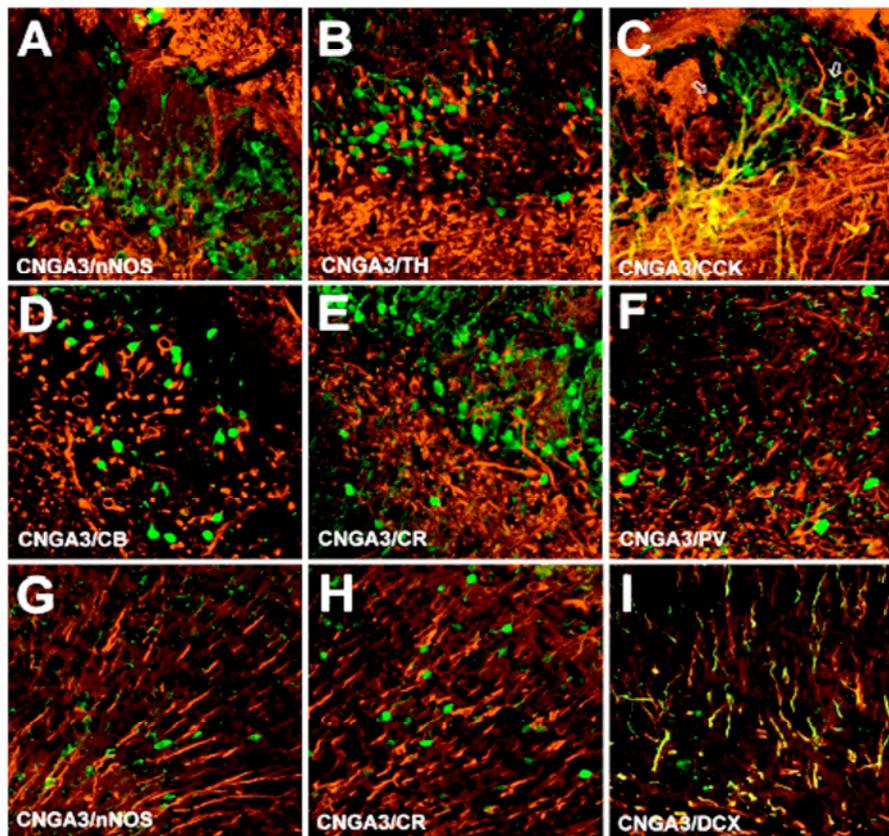


Figure 10