

2

El Sistema Olfativo de los Insectos

FABIO GUIDOBALDI¹ Y PABLO GUERENSTEIN^{1,2}

¹ *Laboratorio de Neuroetología Ecológica, CICYTTP-CONICET, Diamante, Entre Ríos, Argentina;* ² *Facultad de Ingeniería, UNER, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.*
Correo electrónico: pabloguerenstein@cicytpp.org.ar

Resumen. Los insectos confían en gran parte en estímulos olfatorios para su reproducción y supervivencia. Para comprender la fisiología y el papel comportamental y ecológico del sistema olfativo, es necesario conocer las señales que son detectadas en condiciones naturales. Los olores son detectados por neuronas receptoras olfativas (NROs; en inglés Odour Receptor Neuron, ORN), las cuales están situadas dentro de “pelos” llamados sénsulos o sensilas. Los sénsulos olfativos están mayormente localizados en las antenas. Las NROs detectan olores específicos con un variado grado de especificidad y sensibilidad, y proyectan sus axones hacia el centro olfativo primario del cerebro: el lóbulo antenal (LA). Si bien existen fenómenos de interacción entre la información sobre diferentes tipos de entradas de olor a nivel periférico (NROs), es en el LA donde tiene lugar la mayor parte del procesamiento inicial de información olfativa. En el LA la información olfativa está espacialmente representada a través de una arreglo de “glomérulos”. Cuando el insecto es estimulado con un cierto olor, en el LA se forma una “imagen olfativa” estereotipada. Esta imagen posee múltiples no-linealidades: por ejemplo, no se puede predecir *a priori* cómo será la imagen producida por una mezcla de olores a partir de información sobre las imágenes evocadas por los componentes individuales de la mezcla de olores. En el LA, las NROs hacen sinapsis con interneuronas del LA. La imagen olfativa está modulada por interacciones inhibitorias dadas por interneuronas locales del LA. Otras interneuronas del LA son las neuronas de proyección cuyos axones terminan en el protocerebro, un centro de integración multimodal. Entre las técnicas para el estudio de la fisiología del sistema olfativo se cuentan el electroantenograma, registro unicelular (nivel periférico), y el registro intracelular, registro multicanal y registro de imágenes de calcio (nivel de sistema nervioso central). Estas técnicas permiten realizar estudios neuroetológicos para explorar las bases neuronales del comportamiento olfativo. En este capítulo se tratarán aspectos de la morfología del sistema olfativo, se delinearán los últimos conocimientos acerca de las bases moleculares de la quimiorrecepción a nivel periférico, se describirá la fisiología olfativa básica, y finalmente se abordarán en forma breve los principales métodos para su estudio.

Introducción

La detección de señales químicas (quimiorrecepción) del medio ambiente puede darse por medio de olfacción o gustación, dependiendo de si el estímulo se percibe en el aire o a través de contacto físico, respectivamente. En insectos, las señales olfativas son detectadas principalmente por la antena y en menor medida por palpos bucales y maxilares, mientras que los receptores gustativos se localizan en varias partes del cuerpo, incluyendo palpos y otras partes de la boca.

Los insectos confían en gran parte en los estímulos olfatorios para su supervivencia y reproducción. Desde un macho que utiliza feromonas emitidas por la hembra para localizarla, hasta una hembra guiándose por olores para determinar dónde depositará sus huevos, las señales olfativas juegan un papel preponderante como moduladores del comportamiento de los insectos. Mucho es lo que se ha avanzado en el conocimiento sobre olfacción en insectos en la última década, esto se ha debido en parte al avance de técnicas moleculares, fisiológicas, de microscopía, así como por un mayor conocimiento de la historia natural de muchos insectos-modelo.

Los insectos son buenos modelos para hacer estudios de neurofisiología, especialmente de olfacción ya que, por ejemplo, se conoce el ambiente olfativo natural de muchas especies y en consecuencia es posible llegar a entender las bases neuronales del comportamiento olfativo; esto es, cómo los circuitos neuronales procesan los estímulos olfativos y seguidamente generan la actividad comportamental. Es necesario enfatizar que para llevar a cabo experimentos de neurofisiología y comportamiento olfativo se deben utilizar condiciones experimentales (por ejemplo, concentraciones de olor a ensayar, olor no blanco de fondo) acordes con la realidad. En caso contrario, es posible que las respuestas obtenidas no sean comparables a las evocadas en condiciones naturales, y en consecuencia, que los resultados experimentales no sean válidos.

En este capítulo se tratarán aspectos de la morfología del sistema olfativo, se delinearán los últimos conocimientos acerca de las bases moleculares de la quimiorrecepción a nivel periférico, se describirá la fisiología olfativa básica, y finalmente, se abordarán brevemente los principales métodos para su estudio.

Aspectos morfológicos básicos

En el ambiente existe gran cantidad de compuestos volátiles, llamaremos entonces olores a los compuestos volátiles que son percibidos por los seres vivos. En insectos, la detección de olores se lleva a cabo principalmente en las antenas, aunque algunos apéndices bucales (palpos) también pueden cumplir esta función. Una antena típica consta de 3 segmentos: escapo (típicamente corto), pedicelo y flagelo (típicamente largo). Las neuronas receptoras olfativas (NROs) responsables de la detección de olores están situadas dentro de “pelos olfativos” inervados llamados sénsulos olfativos, los cuales están distribuidos en antenas y palpos. Dentro de las antenas, los axones de las NROs forman en general dos nervios por antena, los cuales se fusionan para luego alcanzar el cerebro del insecto (Keil, 1999).

Existen distintos tipos morfológicos y funcionales de sénsulos olfativos y se encuentran varios tipos morfológicos y funcionales en una misma antena.

Distintos tipos morfológicos suelen reflejar diferente funcionalidad de los NROs que están dentro, e incluso dentro de un tipo morfológico de sénsulos se pueden distinguir diferentes sub-tipos funcionales (Diehl *et al.*, 2003). Además de las NROs existen las neuronas especializadas en estímulos gustativos, mecánicos, térmicos, de humedad y CO₂. En algunos casos un mismo sénsulo contiene neuronas receptoras para estímulos de distinta modalidad (Altner & Prillinger, 1980). Un sénsulo puramente olfativo tiene de una a muchas NROs bipolares y células auxiliares (Figura 1). Las dendritas de las NROs se extienden dentro del proceso cuticular del sénsulo, donde pueden bifurcarse, mientras que los axones atraviesan la membrana basal y contribuyen a la formación de los nervios que llegan al cerebro.

Existen tres tipos de células auxiliares. Estas son las células tecógena, tricógena y tormógena. Durante el desarrollo las tres células (usualmente uno de cada tipo por sénsulo) secretan estructuras cuticulares que dan lugar al sénsulo. Una vez desarrollado el sénsulo, la célula tecógena rodea las neuronas, mientras que las células tricógena y tormógena, juntas, contribuyen al “espacio linfático externo” del sénsulo, que rodea a las dendritas de las NROs (Figura 1). Estas últimas células tienen una superficie altamente invaginada y contribuyen a mantener una composición química adecuada de la linfa del sénsulo, de manera que las NROs funcionen correctamente (Keil, 1999). Por ejemplo, las células tricógena y tormógena se ocupan activamente de mantener concentraciones iónicas de la linfa que sean adecuadas; así, transportan activamente

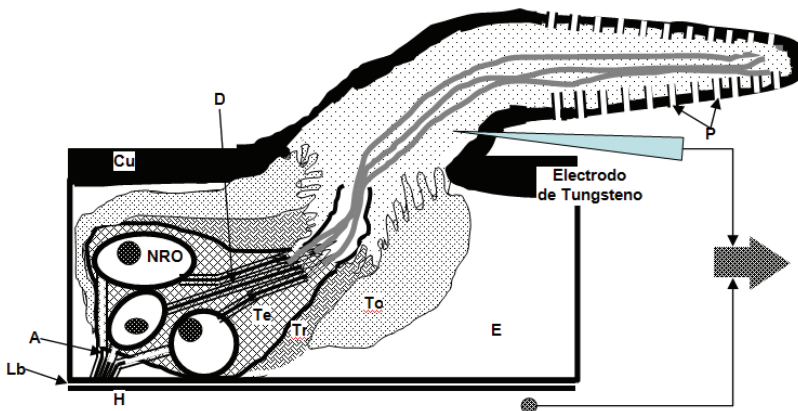


Figura 1. Esquema de la estructura interna de un sénsulo olfativo mostrando células accesorias (Te: tecógena; Tr: tricógena; To: tormógena) y neuronas receptoras (NRO). También se muestra la posición de los electrodos de registro y de referencia para registros de sénsulo único. P: poros, Cu: cutícula; E célula epidérmica, A: axón; D: base de dendrita; Lb: lámina basal H: hemolinfa.

K^+ hacia la linfa del sénsulo, lo cual contribuye a un voltaje transepitelial positivo (de hasta 40 mV) entre esta linfa y la hemolinfa, y una inusualmente alta concentración de K^+ en la linfa (extracelular) del sénsulo (Stengl *et al.*, 1999).

Al abrirse los canales iónicos en respuesta a la llegada de olores específicos se producen los fenómenos de conducción eléctrica (iónica) que llevan a la generación de potenciales de receptor (cambio de voltaje en estas membranas) que posteriormente, a partir del cono ax nico, se convierten en potenciales de acción que “viajan” por el axón de la neurona (véase más adelante).

En cuanto a morfología, los sénsulos se clasifican de acuerdo con la estructura de su pared cuticular. Los tres tipos encontrados se presentan:

- 1) con poros en la pared (PPa, generalmente olfativas),
- 2) con un poro en la punta (PPu, generalmente gustativas) y
- 3) sin poros (SP, generalmente mecanorreceptoras o térmicas/hidrorreceptoras).

Los sénsulos PPa, olfativos, pueden, a su vez, tener una pared única o pared doble (también llamadas “grooved-peg” y sénsulos celocónicos). Finalmente, los sénsulos de pared única se dividen en sénsulos de pared fina (p. ej. sénsulos basic nicos) o de pared gruesa (p. ej., sénsulos tricoideo) (Altner, 1977; Altner & Prillinger, 1980) (Cuadro 1).

Los sénsulos que contienen las neuronas receptoras de CO_2 suelen ser tipos particulares de sénsulos con poros en una pared única fina (Stange & Stowe, 1999). Su forma puede ser la de un sénsulo ampul ceo (“pelo” de 15-20 μm en la base de un canal de 20-50 μm bajo la superficie de la antena) como en la hormiga *Atta cephalotes* (Kleineidam & Tautz, 1996), ser plana en la parte superior, como un palo de golf invertido (como en la polilla *Cactoblastis cactorum*; Stange & Stowe, 1999), ser bulbosa

CUADRO 1. Principales tipos de sénsulos olfativos (con poros en la pared, PPa). Los PPa-pared única poseen poros con poro-túbulos mientras que los poros de las PPa-pared doble no tienen poro-túbulos (basado en Keil, 1999).

Sénsulos olfativos	Tricoidea	Basic�nico	Placoidea (subtipo de basic�nico)	Celoc�nico/ grooved peg
Pared cuticular	PPa-pared única y gruesa	PPa-pared única y fina	PPa-pared única y fina	PPa-pared doble
Largo en μm (forma)	30-600 (punta aguda)	10-80 (punta redondeada)	Plato oval a nivel de la superficie	6-12
Número de NROs	1-3	1-50	Hasta 140	4-5
Características de NROs	Dendritas sin bifurcación	Dendritas bifurcadas	Dendritas bifurcadas	Dendritas sin bifurcación

en la parte superior como en moscas picadoras de la familia Ceratopogonidae (Stange & Stowe, 1999). En general, los sénsulos con neuronas receptoras de CO₂ contienen pocos NROs, con frecuencia solo una neurona (Kent *et al.*, 1986). Las dendritas suelen tener varias bifurcaciones y ser lameladas, lo cual aumenta significativamente su superficie (Stange & Stowe, 1999).

A veces los sénsulos, en especial los que detectan CO₂, están agrupados dentro o fuera de estructuras especiales. Estar dentro de estructuras especiales (p. ej. el órgano en foso del palpo labial —“labial palp pit organ”— de lepidópteros, capsula del órgano de Haller en garrapatas, etc.; Stange & Stowe, 1999) podría dar una ventaja extra a estos sénsulos en cuanto a resistencia a la desecación y a daño físico, así como también resultar en un sensor “puntual” que maximiza la resolución espacial de la información detectada. El órgano en cueva del palpo labial puede contener más de 1700 sénsulos dentro de una cavidad con una apertura al exterior de menos de 100 μm (Kent *et al.*, 1986; Guerenstein & Hildebrand, 2008).

La pared cuticular de los sénsulos están recubiertos externamente por una capa epicuticular lipídica. Como la mayoría de las moléculas de olor tienen propiedades lipofílicas, estas moléculas se disuelven (se adsorben) en esta capa al contactar el sénsulo (es decir, son “capturadas” del aire que rodea) y eventualmente llegan a un poro por donde penetran en el sénsulo. En los sénsulos tricoideos, basicónicos y placoides estos poros conducen a un sistema de canales, cada uno llamado poro-canal, dentro de la cutícula, que se continúa con un sistema de poro-túbulos. Tanto los canales como los túbulos son de naturaleza lipídica.

Los poro-túbulos terminan dentro de la linfa de los sénsulos y se considera que forman una estructura continua con la capa lipídica epicuticular (Keil, 1999). En los sénsulos celocónicos/“grooved peg” los poros conducen a un sistema de canales radiales que atraviesa la doble pared cuticular hasta llegar a la linfa interna de los sénsulos sin que existan poro-túbulos (Keil, 1999). Una vez que alcanzaron la linfa del sénsulo, las moléculas de olor son solubilizadas al ser encapsuladas por proteínas (véase más adelante) que las transportan hasta los receptores de olor de la membrana dendrítica de las NROs, donde la señal química se transduce en señal eléctrica que informa al cerebro sobre el ambiente externo.

El cerebro de los insectos ha sido dividido en tres regiones, el protocerebro, deutocerebro y tritocerebro (Figura 2). El protocerebro incluye principalmente el complejo central, los cuerpos pedunculados, el cuerno lateral, mientras que los lóbulos ópticos son sus extensiones laterales. El deutocerebro incluye los lóbulos antenales (LA, que funcionan principalmente como lóbulos olfatorios) y el centro mecano-sensorial y motor de la antena, mientras que el tritocerebro es una pequeña región que comprende un par de lóbulos debajo del deutocerebro (Chapman, 1998).

Los axones de las NROs ubicados en la antena salen del sénsulo y en conjunto forman el nervio antenal (NA). Estos axones se proyectan hacia el LA, el centro olfativo primario del cerebro. Los axones de las NROs ubicados en las partes bucales también se proyectan hacia el LA, aunque a través de otros nervios (p. ej. el nervio

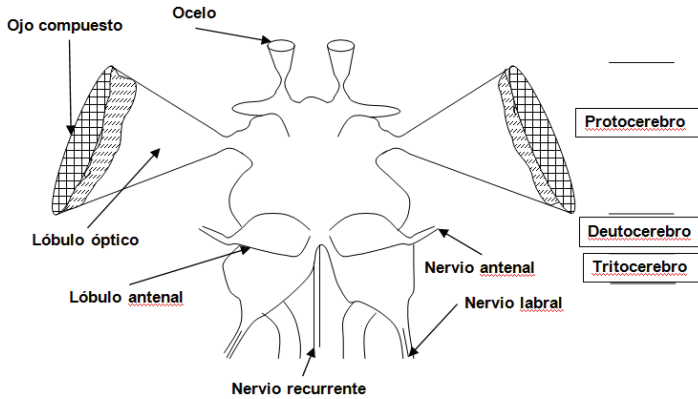


Figura 2. Representación del cerebro de un insecto modelo.

del palpo labial) y, luego de entrar al Sistema Nervioso Central (SNC), alcanzan el LA a través de los ganglios sub-esofágicos (p. ej. en el órgano cueva del palpo labial de lepidópteros, Kent *et al.*, 1986). El LA contiene un arreglo de estructuras llamadas glomérulos, donde terminan los axones de las NROs. Es en los glomérulos donde los axones de las NROs hacen sinapsis con las inter-neuronas del LA (es decir, con inter-neuronas que tienen su cuerpo celular en el LA). Por otro lado, en el LA también arborizan neuronas “centrífugas” que tienen su cuerpo celular en otras regiones del SNC (Christensen & Hildebrand, 1987; Anton & Homberg, 1999). Los glomérulos son considerados unidades funcionales del LA y su forma aproximadamente esférica es, en general, definida ya que una capa de células gliales los rodea individualmente (Hildebrand, 1996). Usualmente un determinado glomérulo recibe terminales de axones de un solo tipo funcional de NRO (Hildebrand, 1996; Vosshall *et al.*, 1999), es decir, de NROs con un mismo tipo de perfil de respuesta a olores. Si bien existen fenómenos de interacción de información entre diferentes tipos de entradas de olor (entre diferentes NROs) a nivel periférico (Nikonov & Leal, 2002), es en el LA donde tiene lugar la mayor parte del procesamiento inicial de información olfativa. El número de glomérulos en el LA es de poco más de 40 en *Drosophila* y poco más de 60 en *Manduca* (Anton & Homberg, 1999).

Las inter-neuronas del LA incluyen las inter-neuronas locales (NLs) y las neuronas de proyección (NPs). Las neuritas de las NL no salen del LA y establecen conexiones entre distintos glomérulos del LA, siendo cruciales para la integración de información, fenómenos inhibitorios y excitatorios laterales (véase la sección fisiología olfativa). Las NL pueden arborizar sólo en algunos pocos glomérulos del LA o en virtualmente todos ellos (Figura 3) (Christensen & Hildebrand; 1987, Anton & Homberg, 1999; Reisenman *et al.*, 2011). Las neuritas de estas neuronas no se diferencian en dendritas y axón: la información fluye bidireccionalmente en cada neurita

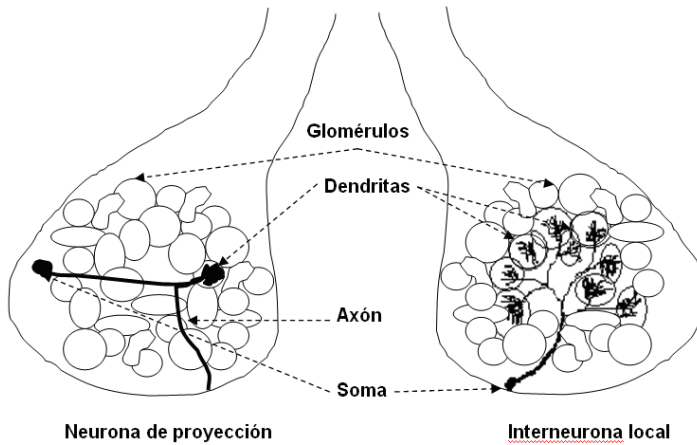


Figura 3. Lóbulos antenales mostrando los glomérulos. Se muestran las características morfológicas de una neurona de proyección y de una interneurona local típica.

y cada neurita puede cumplir ambas funciones. Las dendritas de las NP arborizan en uno o varios glomérulos, denominándose uniglomerulares o multiglomerulares, respectivamente (Figura 3). El axón de las NP sale del LA y lleva la información hacia centros de procesamiento de información superiores en el protocerebro.

Los glomérulos del LA pueden caracterizarse con base en su forma, tamaño y posición dentro del LA, es decir, que estos parámetros están estereotipados dentro de cada especie (Galizia *et al.*, 1999). Se sabe que en muchas especies de insectos existen dos subsistemas olfativos (Galizia & Rossler, 2010). Esta división en subsistemas se refleja en el LA: uno de los subsistemas posee glomérulos que son idénticos en los dos sexos, mientras que los glomérulos del otro subsistema son diferentes en hembras y machos. Mientras que los primeros glomérulos suelen estar dedicados en gran parte a procesamiento de información relacionada con comida (glomérulos ordinarios), los últimos suelen estar relacionados con información sobre feromonas (macroglomérulos). Entre los glomérulos ordinarios se encontró, en varias especies de insectos, uno especializado en procesar información relacionada con CO_2 (Guerenstein *et al.*, 2004; Guerenstein & Hildebrand, 2008).

Los centros de procesamiento a los que proyectan las NP del LA incluyen los cuerpos pedunculados y el cuerno lateral (de Belle & Kanzaki, 1999; véase sección fisiología olfativa). Los cuerpos pedunculados han sido asociados a fenómenos de memoria y aprendizaje, mientras que en los cuernos laterales podría ocurrir integración multimodal de información (por ejemplo, integración de información olfativa con información visual). El complicado patrón de proyecciones de las NP del LA en el protocerebro sugiere múltiples fenómenos de convergencia y divergencia de información.

Eventos en el compartimiento perirreceptor y mecanismos de transducción

Como se mencionó anteriormente, las moléculas de olor que alcanzan la antena, ingresan a los sénsulos a través de poros en su pared cuticular, atraviesan la linfa acuosa del sénsulo y finalmente alcanzan las dendritas de las NROs. Allí se lleva a cabo la transducción del estímulo olfativo en potencial receptor de membrana, que luego resulta en una tasa de potenciales de acción, que codifican las propiedades biológicas relevantes del estímulo olfativo. La entrada, residencia y salida de las moléculas de olor del ambiente alrededor del receptor han sido denominadas en su conjunto “eventos en el compartimiento perirreceptor”.

En la sección anterior se mencionó que la linfa de los sénsulos suele poseer una concentración alta de proteínas solubles. Estas macromoléculas transportan los compuestos de olor hasta los receptores de la membrana dendrítica de las NROs. Estos receptores suelen estar especializados en la detección de un tipo de “olor individual” (debe aclararse que lo que conocemos como “olores” en realidad son con frecuencia “mezcla de olores”; nos referiremos a olor individual como un componente de una mezcla de olores). Estas macromoléculas (proteínas) son de cadena relativamente corta (no más de 150 aminoácidos como máximo), tienen afinidad para enlazarse a pequeños ligandos (10-20 átomos de carbono), como por ejemplo compuestos volátiles que representan olores y un bajo punto isoeléctrico (pI: pH al cual no tienen carga eléctrica neta). Estas proteínas pueden pertenecer a la familia de “proteínas enlazantes a olores”, PEOs (en inglés, Odorant Binding Protein, OBP) (Vogt & Riddiford, 1981), o a la familia de “proteínas quimiosensoriales”, PQSs (en inglés, Chemosensory Proteins, CSPs; Bohbot *et al.*, 2010).

Existe una gran variedad de tipos de PEOs y PQSs en distintas especies de insectos. Se reconocen cuatro clases de PEOs basados en su secuencia de aminoácidos: “proteínas enlazantes a feromonas” (en principio feromonas sexuales de lepidópteros; Pheromone Binding Proteins, PBPs), dos tipos de “proteínas enlazantes a olores generales” (en inglés, General Odorant Binding Protein, GOBP1 y GOBP2) y “proteína antenal X de enlace” (en inglés Antennal Binding Protein X, ABPX) (Pelosi *et al.*, 2006). En la mayoría de los casos, casi lo único que las PEOs tienen en común es un patrón de seis cisteínas en posiciones conservadas en los distintos órdenes de insectos.

Estas cisteínas están dispuestas en un arreglo que confiere gran estabilidad a la proteína. Si bien aún se están investigando la función exacta de éstas, las PEOs permiten que las moléculas de olor (mayormente las hidrofóbicas), atraviesen el medio acuoso (la linfa del sénsulo) y puedan alcanzar las membranas de las dendritas de las NROs para allí estimular las proteínas receptoras de olor (véase más adelante). Para esto, las moléculas de olor se unen reversiblemente y con gran afinidad a las PEOs, lo cual genera un cambio conformacional en ellas. Así, las moléculas ligadas viajarían por la linfa hasta encontrar una proteína receptora de olor, en cuyo caso el complejo olor-PEO (o sólo el olor) dispararían la cascada de traducción de señales que conduce a la generación de una señal eléctrica para ser transmitida al cerebro (Leal,

2005; Pelosi *et al.*, 2006). Este complejo (o sólo el olor) sería finalmente destruido (existen enzimas que degradan moléculas de algunos componentes feromonales) y las PEOs son recicladas, con la ayuda de las células accesorias del sésulo; un modelo alternativo propone que sólo el olor es degradado mientras que las PEOs vuelven a su conformación original pudiendo nuevamente unirse a moléculas de olor (Pelosi *et al.*, 2006).

Sin embargo, no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual las PEOs facilitan el transporte de las moléculas de olor y recientemente se ha hablado de un papel en la formación de una especie de canal (túnel) hidrofóbico que permitiría el rápido paso de las moléculas de olor. Se ha demostrado que, al menos algunas PEOs, tienen alta especificidad de unión a un olor en particular y se ha propuesto un papel de las PEOs como filtros y responsables parciales de la selectividad de las respuestas a olores (Leal, 2005).

En los mismos sésulos olfativos se pueden encontrar más de un tipo de PEO (Hekmat-Skafé *et al.*, 1997). Se cree que las PEOs que se encuentran en la linfa de los sésulos son biosintetizadas en las células tormógenas y tricógenas (Pelosi *et al.*, 2006).

Las PQSs son más pequeñas que las PEOs y tienen una secuencia de aminoácidos muy diferente a estas últimas. Presentan cuatro cisteínas en posiciones conservadas y como las PEOs sufren cambios conformacionales al unirse a un ligando (Pelosi *et al.*, 2006). Las PEOs y las PQSs fueron también encontradas en sésulos gustativos. Por otro lado, no todas las PEOs, y en especial no todas las PQSs (designadas así con base en su secuencia de aminoácidos), tienen función quimiosensorial. Por ejemplo, también se ha asignado a ambos tipos de proteínas una función en la liberación (transporte) de señales químicas (como feromonas) desde su sitio de producción al ambiente (Pelosi *et al.*, 2006).

En algunos casos se ha demostrado que las PEOs y PQSs no son necesarias para que las dendritas de las neuronas sensoriales olfativas sean excitadas (Pelosi *et al.*, 2006). Sin embargo, en estos experimentos, esta excitación se produjo más tardíamente respecto de aquélla en presencia de PEOs. Por otro lado, existen también contra ejemplos en los que no se alcanza excitación de las dendritas sin la presencia de las PEOs. Es decir, que las PEOs son sumamente importantes para que un insecto pueda responder de manera normal y con la rapidez necesaria a los estímulos olfativos (Pelletier *et al.*, 2010).

Mucho se ha avanzado en la caracterización de las proteínas receptoras de olor en los últimos años. Se sabe que las proteínas receptoras que cumplen la función de detección de olores (y transducción de señal) en las membranas dendríticas de insectos consisten de un complejo heteromérico compuesto de al menos dos subunidades. Una de las subunidades es un “co-receptor”, llamado Or83b en *Drosophila*. El co-receptor no interactúa directamente con el ligando (molécula de olor) y no contribuye a la especificidad de respuesta a olores. Además del co-receptor, se encuentra una (a veces más) subunidad a la que se une el ligando, es decir, una subunidad que tiene

un sitio de unión para la molécula de olor (o la molécula de olor unida a una PEO). Con frecuencia se llama a esta segunda subunidad/es “receptor olfativo” (ROs). Existen numerosas variantes de ROs, ya que es la subunidad que da la especificidad de respuesta a la proteína receptora de olor. El perfil reactivo (es decir, de respuesta) de la proteína receptora depende del RO. Una NRO determinada expresa generalmente un solo tipo de RO, pudiendo expresar hasta tres tipos (Vosshall *et al.*, 1999; Galizia & Sachse, 2010). Hoy día se sabe que en *Drosophila* Or83b, de función desconocida durante años, sólo contribuye a la función de los ROs. Han sido identificados homólogos del co-receptor Or83b en varias especies de insectos. Los ROs de los insectos no tienen homología con los receptores quimiosensoriales acoplados a proteína-G de los vertebrados (Buck & Axel, 1991), sino que pertenecen a una nueva familia de proteínas (Clyne *et al.*, 1999; Vosshall *et al.*, 1999). Sin embargo, los ROs (y co-receptor) de insectos son proteínas que atraviesan la membrana dendrítica (saliendo y entrando a la neurona) siete veces, y por eso pertenecen a las proteínas “de siete transmembranas” (en inglés, Seven-Transmembrane Proteins).

Por años se pensó que en insectos la estimulación con olor provocaba principalmente activación de la fosfolipasa C a través de una proteína G acoplada al receptor, lo cual resultaba en un aumento de la concentración de inositol trifosfato (IP3). El aumento de IP3 abriría canales de Ca^{+2} dependientes de IP3 y produciría un aumento de la concentración intracelular de Ca^{+2} . Este aumento, a su vez, provocaría la apertura de canales de cationes no específicos que permitiría la entrada de diferentes cationes (entre ellos K^+ , además de Na^+ y Ca^{+2}), con lo cual se generaría despolarización (es decir, que el potencial de membrana se hace más positivo) (Stengl *et al.*, 1999). También se propuso una vía que involucra al cAMP (AMP cíclico) como segundo mensajero. Las bases moleculares de la estimulación olfativa aun no son totalmente conocidas y no puede ser descartado el rol de proteínas-G (véase más adelante, Wicher *et al.*, 2008).

Recientemente se ha propuesto que el mismo complejo RO-Or83b representa una nueva clase de canal de cationes no-selectivo activado por ligandos. Luego de estimulación con olores, se observó una entrada de Ca^{+2} en la NRO y un aumento en la conductancia no-selectiva de cationes, mientras que se propone que las corrientes iónicas relacionadas con RO-Or83b son independientes de las vías conocidas que involucran segundos mensajeros relacionados con proteína-G acoplada a receptores (Sato *et al.*, 2008). Por otro lado, también se ha propuesto que el co-receptor (Or83b) representa un canal iónico activado por cAMP intracelular. En consecuencia, los complejos de receptores de olor de insectos funcionarían como un canal activado directamente por ligandos (la subunidad RO, activada por ligando, activa a la subunidad co-receptor/canal) así como también como complejo de RO más canal de cationes no-selectivo (Co-receptor), este último activado por nucleótidos cíclicos vía proteína G y adenilato ciclasa (Wicher *et al.*, 2008). Es decir, el co-receptor/canal podría ser activado directamente por el RO o indirectamente por nucleótidos cíclicos. Este diseño de complejo de receptor olfativo (particular de insectos) con una subuni-

dad activada por olores y otra que transduce la señal química en una señal eléctrica (despolarización de la membrana dendrítica) asegura una muy rápida identificación de olores a altas concentraciones por medio de una vía ionotrópica (receptor con canal iónico activado por ligando), así como una detección de olores más lenta, pero altamente sensible y prolongada, por medio de una vía metabotrópica (a través de segundos mensajeros) de amplificación de señal mediada por proteína-G (Wicher *et al.*, 2008; Figura 4).

En el caso de una subpoblación de NROs se ha identificado que es esencial un cofactor para que estas neuronas respondan. Este cofactor pertenece a la previamente conocida familia CD36 de receptores transmembrana que se unen a moléculas lipídicas para su transporte y señalización. Los homólogos de CD36 en *Drosophila* han sido llamados proteínas neuronales sensoriales de membrana (PNSMs) y se expresan en NROs implicados en la detección de feromonas derivadas de lípidos (Benton *et al.*, 2007). Mientras que las PNSMs son esenciales para obtener respuestas en NROs que

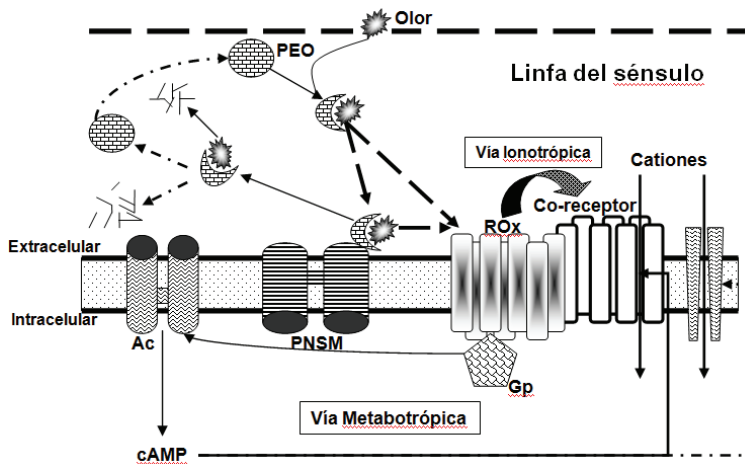


Figura 4. Modelo de mecanismos de transducción de señal olfativa en sensorios tricoideo y basicónico. El modelo presentado contempla las más importantes hipótesis. Luego de atravesar el sistema de poros de la cutícula del sensorio, una molécula de olor es transportada por una PEO hasta la membrana dendrítica de un NRO. Allí puede unirse a una PNSM (proteína neuronal sensorial de membrana) y por medio de este a un RO, o puede unirse directamente al RO dependiendo del sistema olor-RO del que se trate. Una vez unido el olor al R) se activarían dos vías: 1) la ionotrópica que abre canales de cationes inespecíficos representados al menos en parte por un correceptor-canal y, 2) la metabotrópica que involucra producción de AMP cíclico a través de activación de adenilato ciclasa (AC), lo cual resulta en apertura de canales de cationes inespecíficos. Luego de activar al RO, el complejo PEO-olor se separa de este RO. La molécula de olor es degradada por enzimas, mientras que no se sabe con certeza si la PEO es también degradada o reciclado. Líneas continuas indican eventos que se conocen con certeza y son invariables. Líneas interrumpidas largas indican distintas variantes de eventos que pueden ocurrir. Líneas con rayas y puntos indican eventos que no se conocen con certeza.

detectan feromonas con base lipídica, no lo son en NROs que detectan compuestos no lipídicos. Se ha sugerido que las PNSMs actúan con ciertos ROs para capturar moléculas de feromona en la superficie de las dendritas de las NROs (Benton *et al.*, 2007). Más aún, se piensa que los PNSMs establecen un puente molecular entre ligandos feromonales y ciertos ROs (Bohbot *et al.*, 2010).

Llamativamente, las NROs de los sénsulos celocónicos no expresan Or83b u ROs (Scott *et al.*, 2001; Couto *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2005), salvo excepciones (Benton *et al.*, 2009). Estas NROs suelen responder a ácidos carboxílicos, amoníaco, aminas, aldehídos de cadena corta (p. ej. Diehl *et al.*, 2003, Benton *et al.*, 2009). En estos casos la membrana dendrítica de las NROs posee una familia de quimiorreceptores diferente a los ROs, según ha sido recientemente propuesto para *Drosophila* (Benton *et al.*, 2009). Esta familia de receptores, relacionada con los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) que están involucrados en comunicación sináptica entre neuronas tanto de vertebrados como de invertebrados, ha sido llamada receptores ionotrópicos (RIs). Los RIs difieren de los típicos iGluRs en que no poseen sitios de unión a glutamato: los sitios de unión a ligandos son altamente divergentes. Por ejemplo, las neuronas que expresan IR64a1 tienen sitios de unión específicos para detectar acidez (Ai *et al.*, 2010). La región molecular más conservada entre RIs y iGluRs sería la que corresponde al poro del canal iónico, lo cual sugiere que los RIs tienen propiedades de conducción iónica similares a los iGluRs. En general, las RIs se expresan en NROs que no expresan ROs u OR83b. Sin embargo, como los ROs, los RIs también formarían canales iónicos activados directamente por olores (Benton *et al.*, 2009). A diferencia del caso de los ROs, en el caso de los RIs existen distintos tipos de correceptores. En general, para su funcionamiento, los RIs deben expresarse en conjunto con uno o a veces con dos correceptores distintos (Abuin *et al.*, 2011). También es posible que en ocasiones se coexpresen en una misma NRO, dos RIs diferentes que se ligan a olores, dando a la NRO un perfil de respuesta particular que resultaría del efecto combinatorio de los dos RIs. Por otro lado, los RIs muestran diferentes especificidades de conducción iónica relacionadas con cierta variabilidad en las secuencias que corresponden a los poros de los canales iónicos (Abuin *et al.*, 2011). Un trabajo reciente describe la compleja interacción fisiológica que la vía olfativa de los RIs tiene con aquélla de los ROs para generar comportamiento (Silbering *et al.*, 2011).

El caso de la detección de CO₂ sería particular. Los receptores moleculares que estarían implicados en la recepción de CO₂ no pertenecerían a la familia de los ROs (ni de los RIs), sino que estarían codificados por la familia de genes GRs (receptores gustativos). Los GRs son proteínas de siete dominios transmembrana que han sido inicialmente identificados en órganos gustativos, pero hoy se sabe que existen proteínas codificadas por esta familia de genes que tienen función olfativa (Kent *et al.*, 2007). En *Drosophila*, se sabe que dos GRs se co-expresan en las neuronas receptoras que detectan CO₂ (Suh *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2007). La co-expresión de ambos genes es necesaria y suficiente para evocar respuestas a CO₂ y se piensa que estos GRs forman un receptor molecular heterodimérico (Jones *et al.*,

2007; Kwon *et al.*, 2007). En mosquitos, tres GRs co-expresados estarían implicados en la detección de dicho compuesto (Lu *et al.*, 2007). Recientemente, se ha encontrado que las proteínas-G (especialmente G α) tienen un rol en las respuestas de las neuronas sensoriales que detectan CO₂ (Yao & Carlson, 2010).

Se ha propuesto que los eventos en el compartimiento perirreceptor definen dos tipos de quimiorreceptores esencialmente distintos (Kaissling, 1998). En los “detectores de concentración”, la concentración de estímulo presente en el compartimiento perirreceptor está en equilibrio con (igualada a) la concentración en el exterior del sáculo. Es decir, la situación es similar a los receptores moleculares de la membrana dendrítica directamente expuestos al exterior; o sea que en la dendrita se representa la situación real externa. Esto sería debido a que la entrada del estímulo al compartimiento perirreceptor es reversible, y el estímulo puede salir si la concentración externa fuera menor que aquella en la linfa del sáculo. Este sería el caso de los detectores de CO₂ (y de al menos algunos detectores gustativos). En este caso, no es necesario un sistema de desactivación del estímulo (Kaissling, 1998).

En el segundo caso, el de los “detectores de flujo”, el estímulo que ingresa al compartimiento perirreceptor lo hace de manera irreversible, por lo que se acumula allí. La única manera de que el estímulo desaparezca en este caso es la desactivación del mismo (esta desactivación parece limitar el proceso de transducción de señal). En este caso lo que se detecta es el flujo de moléculas que “choca” contra la pared del sáculo y son adsorbidas irreversiblemente. Al menos la mayoría de los receptores olfativos serían detectores de flujo. Mientras que la respuesta de los detectores de concentración depende exclusivamente de la concentración externa, en los detectores de flujo la respuesta depende de la concentración externa y de la velocidad relativa del medio circundante respecto al sáculo (a causa del viento o del movimiento del insecto). Una manera simple de distinguir entre un detector de flujo y uno de concentración es poner a prueba su sensibilidad a la velocidad relativa del medio circundante (p. ej. aire) usando métodos de registro neuronal (Kaissling, 1998).

Fisiología olfativa

Nivel periférico

La función del sistema olfativo es informar al cerebro, en una fracción de segundo, sobre la calidad, cantidad y características temporales del estímulo olfativo. Es decir, se debe informar sobre la identidad del olor, si es un compuesto simple o una mezcla de olores, y en este último caso no sólo las identidades de los componentes, sino también las proporciones en los que se encuentran. Por otro lado, se debe informar la concentración absoluta de los compuestos percibidos y finalmente si el estímulo se presenta en forma continua o intermitentemente, y en este último caso, con qué frecuencia.

En registros de señales eléctricas en la linfa de un sáculo olfativo hay un potencial transepitelial (PTE) de reposo positivo (comúnmente de entre +30 y +40 mV),

causado por la actividad de una bomba iónica electrogénica en las células tormógena y tricógena. Cuando el sésulo es estimulado, el PTE muestra una deflexión negativa (es decir, se hace temporalmente más negativo, se despolariza). Este cambio en el potencial, en la dendrita, llamado potencial de receptor (potencial graduado), puede ser de hasta 30 mV (es decir, se puede llegar a un PTE cercano a 0 mV, Kaissling, 1995). Este componente de la respuesta a un estímulo es de baja frecuencia y se le llama comúnmente componente de corriente directa.

Por otro lado, los potenciales de receptor viajan por la dendrita hacia el soma celular y antes de alcanzar el axón, se convierten en potenciales de acción (PA, en inglés también llamados “spikes”). Los PA constan de una primera fase positiva que alcanza, como máximo, unos pocos mV, seguida por una más pequeña fase negativa. La polaridad opuesta de la primera fase del PA respecto al potencial de receptor se explica, en parte, por la ubicación opuesta de las regiones electro-generadoras (Kaissling, 1995). El potencial negativo del receptor es generado en la parte apical de la dendrita de las NROs, rodeada de la linfa externa del sésulo, mientras que los PA son generados en las membranas basolaterales del soma de las NROs, el cual está rodeado de la linfa interna del sésulo, limitada por la célula tecógena (Kaissling, 1995; Keil, 1999).

Los potenciales de receptor se transforman en una frecuencia de PA que viajan por el axón hacia los terminales del mismo. Cuanto mayor es el estímulo, mayor la amplitud del cambio de voltaje del potencial de receptor y mayor la frecuencia de PA. La frecuencia de PA de una población de NROs representa un código que involucra información sobre las variables del olor mencionadas anteriormente (identidad y concentración del olor, etc.).

Existen olores que causan, en ciertas NROs, una respuesta opuesta a la mencionada. Así, ante la llegada de olor, en estos casos se observa una deflexión positiva del PTE, que es acompañada por una reducción o cesación de los PAs (de Bruyne *et al.*, 1999; Shields & Hildebrand, 2001; Diehl *et al.*, 2003). Es decir, que ante la presencia de un olor individual, una NRO puede no cambiar su frecuencia de PAs, aumentar la frecuencia, o disminuir esa frecuencia (French *et al.*, 2011). Esto resulta en un amplio número de códigos de información posibles. Algunos olores causan aumento de PA en ciertos NROs y disminución en otros. Por otro lado, existen NROs que son excitadas por ciertos olores, mientras que otros olores causan disminución/cesación de PA (de Bruyne *et al.*, 1999, 2001). De todas maneras, lo más común es que una NRO sea excitada ante la llegada de un estímulo.

Las NROs “especialistas” están sintonizadas a responder a un cierto constituyente del olor o a ese constituyente y compuestos muy relacionados. Cuando se estimula una NRO especialista con el compuesto al que está sintonizada, la respuesta que se obtiene es selectiva, sensible y con una curva de dosis-respuesta amplia. Se dice que el compuesto al que una NRO está sintonizada es aquel con menor umbral de respuesta (el concepto de selectividad y sensibilidad están altamente relacionados).

En algunos casos de muy alta selectividad (NROs “especialistas”), prácticamente un solo compuesto evoca respuestas en condiciones de concentraciones naturales (por ejemplo, NROs que responden a algunas feromonas o a CO₂; Kaissling *et al.*, 1989; Guerenstein & Hildebrand, 2008). Por otro lado, existen también NROs “generalistas” que responden a varios compuestos diferentes. Estos compuestos incluso a veces poseen grupos químicos muy diferentes. Esto suele resultar en más de una NRO respondiendo al mismo compuesto (véase más adelante). Entre las NROs especialistas y las generalistas se encuentran numerosos casos de NRO “intermedios”, es decir, que no son selectivas como las especialistas aunque sólo responden a compuestos con alguna similitud, es decir, relacionados en su estructura química.

Ante la presencia de una mezcla de olores, el concierto de NROs de un insecto produciría un patrón de respuesta a través de las NROs, que sería particular para cada mezcla, dentro de un gran universo de posibles respuestas poblacionales (Todd & Baker, 1999; French *et al.*, 2011). Más aún, ciertos constituyentes individuales de una mezcla de olor también pueden evocar respuestas de varios tipos funcionales de NROs (French *et al.*, 2011). Otros, sólo evocarían respuesta de un tipo de NRO específica. La manera de distinguir información sobre constituyentes individuales que evocan respuestas como en el primer caso, implica una comparación de las respuestas de varias NROs, es decir, que cada olor evoca un patrón específico de respuesta a través de la población de NROs y ese patrón específico identifica a ese olor específico (Christensen & Hildebrand, 1987; Anton & Hansson, 1994). A esta forma de codificación de información se la llama “patrón a través de las fibras (axones)” (en inglés, Across Fibre Pattern; Shepherd, 1985). En el segundo caso, la identidad del constituyente de la mezcla de olor estaría dada por el tipo de NRO que ha sido activado en respuesta a ese compuesto. En este caso se habla de codificación de información a través de “línea marcada” (en inglés, Labeled Line; Hildebrand, 1996; Hansson & Christensen, 1999; Thom *et al.*, 2004). Las mezclas de olor indefectiblemente generan un “patrón a través de las fibras” (Kaissling, 1971; Hansson & Christensen, 1999).

El procesamiento de información olfativa se da principalmente en el SNC. Sin embargo, existen trabajos que muestran experimentalmente que incluso a nivel periférico ocurren interacciones entre la información sobre dos olores individuales que son detectados por NROs distintas del mismo sésulo (Nikonov & Leal, 2002). Además, existen casos de integración de información olfativa a nivel periférico en los cuales aún resta por establecer el mecanismo de acción (Ochieng *et al.*, 2002). Se han encontrado fenómenos de inhibición mutua de respuesta entre dos NROs y sinergismo de respuesta cuando ambas NROs son estimuladas. Además, existe evidencia morfológica que sugiere que este fenómeno podría darse en otros insectos, por ejemplo triatominos —insectos chupadores de sangre (Diehl *et al.*, 2003).

Se llama adaptación sensorial al decremento en la sensibilidad de las neuronas receptoras debido a la influencia de una condición de estimulación previa. Las NROs muestran diversos grados de adaptación sensorial, pero en general se adaptan rápidamente, lo cual da lugar a respuestas fásicas, de corta duración, en contraste a

respuestas tónicas de larga duración, mientras está presente el estímulo. En general, existe un componente fásico y algún tipo de componente tónico en la mayoría de las respuestas de las NROs. Así, las NROs responden con más fidelidad a cambios rápidos de concentración que a niveles constantes de olor durante un tiempo prolongado. Por ejemplo, la respuesta de una NRO estimulada constantemente se adapta en forma relativamente rápida y pierde su habilidad inicial de responder. En cambio, en ambientes naturales el olor suele viajar “viento abajo” en una estela de olor. En esta estela existen filamentos de olor que viajan entre espacios de aire limpio (parecido al humo de un cigarro). Un insecto acercándose a la fuente de olor percibiría la estela de olor como estimulaciones intermitentes, a las que puede responder óptimamente sin adaptación. Siguiendo la dirección del viento mientras se continúa recibiendo estimulación intermitente asegura la localización de la fuente de olor (Todd & Baker, 1999). Así, las respuestas fásicas permiten codificar el patrón intermitente de estimulación que se presenta cuando un insecto busca la fuente de una estela de olor (Todd & Baker, 1999).

Las NROs que detectan CO₂ tienen robustos componentes fásicos y tónicos en sus respuestas, lo cual les permite medir tanto los cambios de concentración como la concentración absoluta en el ambiente (Guerenstein *et al.*, 2004, Guerenstein & Hildebrand, 2008). Por otro lado, como las NROs están constantemente midiendo la concentración ambiental (385 ppm), disparan PA constantemente a una tasa relativamente alta y esto da lugar a respuestas tanto de excitación ante aumentos de concentración, como de cesación de PA ante disminuciones de los niveles de CO₂ (Guerenstein & Hildebrand, 2008).

Nivel de SNC

También en el LA se codifica información sobre calidad y cantidad de estímulo, y sobre su patrón temporal (p. ej. intermitencia) y espacial (qué parte del cuerpo ha recibido el estímulo) de presentación (Hansson & Christensen, 1999).

Hoy en día se sabe que en insectos un determinado tipo de NROs en general proyecta a un solo glomérulo y que NROs que responden a compuestos similares proyectan a glomérulos vecinos (Lei *et al.*, 2004; Ignell *et al.*, 2010). Si cada glomérulo del LA representará el final de una línea marcada proveniente de la periferia (NROs), entonces en el LA habría un estricto e inequívoco mapa funcional. En este mapa, cada glomérulo estaría asociado con un compuesto químico en particular (Hildebrand, 1996). Si esto fuera así, sería relativamente fácil para el cerebro decodificar información sobre (identificar) el olor presente en el ambiente: bastaría con reconocer cuál glomérulo está activado (Hansson & Christensen, 1999). Si el sistema de codificación fuera de patrón a través de las fibras, la decodificación sería más compleja ya que hay que identificar y pesar el rendimiento de varios glomérulos (en este caso podría haber superposición de representaciones topográficas a compuestos únicos ya que un mismo olor individual puede activar más de un tipo de glomérulo, y un mismo glomérulo puede estar activado por más de un olor) (Hansson & Christensen,

1999). Probablemente se den ambos casos simultáneamente en el LA de insectos. En ambos casos, de todas maneras, se podría hablar de un mapa quimiotópico en el LA, donde la información topográfica (cuales glomérulos están activados) estaría correlacionada con la identidad del olor presente. Existe evidencia que el mapa quimiotópico es estereotipado, se mantiene de un individuo a otro, salvo diferencias entre sexos en cuanto al sistema de procesamiento de información de feromonas sexuales.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que, a través de NLs, que ramifican en varios glomérulos del LA, se pueden dar interacciones, con frecuencia inhibitorias (muchas NLs liberan GABA, ácido gama amino butírico, como neurotransmisor, véase más adelante), entre glomérulos que modulan el mapa quimiotópico inicial (el mapa marcado sólo por las proyecciones de las NROs). Estas interacciones, por ejemplo, podrían ser de tipo “inhibición lateral” similar a la que se da en el sistema visual y podría servir para aumentar el contraste entre representaciones glomerulares de olor (Christensen *et al.*, 1998; Hansson & Christensen, 1999). También se dan eventos intraglomerulares que pueden afectar la codificación de información (Lei *et al.*, 2002; véase más adelante).

Con frecuencia dos olores similares evocan un patrón espacial de activación glomerular similar. Pero no es sólo la representación espacial del estímulo dentro del LA lo que cuenta. También se representaría información a través del patrón temporal de activación de esos glomérulos: por cuánto tiempo se activan, en qué secuencia, la sincronía de activación de las NPs de los glomérulos activados (Christensen *et al.* 2003; Stopfer *et al.*, 1999; Dacks *et al.*, 2009; Ignell *et al.*, 2010). Así, olores similares pueden ser discriminados usando ambas representaciones del olor, la espacial y la temporal (si así fuera, el potencial de codificación de información olfativa sería muy amplio). Olores disímiles podrían ser discriminados sólo con representación espacial. Debe mencionarse que durante eventos de aprendizaje olfativo, la representación de los olores aprendidos se modifica (Daly *et al.*, 2004).

Para poder evocar comportamientos adecuados en relación con olores, el sistema olfativo tiene que codificar tanto la calidad como la cantidad de un olor. Tanto las NROs como las neuronas del LA resuelven este problema incrementando su frecuencia de PA a medida que la concentración de estímulo aumenta. Como se ya mencionó, los axones de las NROs terminan en los glomérulos del LA donde hacen sinapsis con inter-neuronas de este centro de procesamiento de información. La convergencia de información de muchas NROs en unas pocas interneuronas del LA lleva a una “sensibilidad colectiva” más alta que la sensibilidad de una NRO única (Hansson & Christensen 1999; Ignell *et al.*, 2010). Las NROs suelen responder a aumentos de concentración con un aumento en su tasa de PA dentro de un amplio intervalo de concentraciones, cubriendo varios órdenes de magnitud (con frecuencia tres). Más aún, como dentro de cada tipo de NRO, el intervalo dinámico de las NROs individuales suele ser diferente (aunque superpuesto), el intervalo dinámico poblacional es aun más amplio (Guerenstein *et al.*, 2004). Existe evidencia que en ciertos

circuitos neuronales las respuestas de las NPs son independientes de la concentración del estímulo (Ignell *et al.*, 2010).

Muchas NLs son GABAérgicas (Reisenman *et al.*, 2011), es decir, liberan a las sinapsis químicas GABA, un neurotransmisor que provoca inhibición en neuronas post-sinápticas. Es común que las NROs establezcan primeramente sinapsis excitatorias con NLs, las que, a su vez, establecen sinapsis inhibitorias con NPs. Según esto, si en general las NROs son excitadas por el estímulo, las NPs deberían inhibirse ante una estimulación. Sin embargo, se ha observado que con frecuencia las NPs suelen ser excitadas ante la presencia de estímulo. Se ha comprobado que ciertas NPs están espontáneamente inhibidas por NLs (de segundo grado), las cuales disparan PAs a una frecuencia relativamente alta. Cuando, ante la presencia de un estímulo, las NROs excitan NLs de primer grado, las NLs de segundo grado son inhibidas por las NLs de primer grado (es decir, existen 2 NLs en serie entre las NROs y las NPs). Así, las NLs de segundo grado dejan de inhibir a las NPs y se produce “desinhibición” de las NPs, lo cual resulta en un aumento en la tasa de PA, es decir, una excitación (Christensen *et al.*, 1993).

Las NPs pueden seguir un patrón intermitente de estimulación de hasta por lo menos 10 Hz (Christensen & Hildebrand 1988; Guerenstein *et al.*, 2004). En palomillas (también llamadas polillas en algunos países) se ha encontrado que la capacidad de las NPs para responder a una serie de pulsos intermitentes (como aquellos que se presentan en una estela de olor) está correlacionado con el patrón de respuesta que muestran a un pulso único. Así, en palomillas esta capacidad se encontró relacionada a un patrón de respuesta trifásico (-/+/-) o bifásico (+/-) (Christensen & Hildebrand, 1997; Lei & Hansson, 1999). El patrón trifásico significa que ante un estímulo único, la NP muestra un patrón complejo de respuesta que consiste en una inhibición (e hiperpolarización de la membrana involucrando una NL), seguida de excitación (y despolarización de membrana) y finalmente nuevamente inhibición (e hiperpolarización). El bifásico implica excitación seguida de inhibición. Aparentemente los periodos de inhibición son importantes para “apagar” una NP luego de una excitación y estar listo para comenzar una nueva excitación. Así, en lugar de obtenerse una excitación continua debido a un cierto componente tónico de respuesta, la excitación es interrumpida por periodos de inhibición de manera que sólo queda la parte fásica de la respuesta y sólo son representados los momentos precisos en que el olor choca contra la antena.

En palomillas, la amplitud de la hiperpolarización inicial se correlacionó con la tasa de pulsos que una neurona puede resolver. Cuanto mayor sea esta hiperpolarización (inhibición), mayor será la frecuencia de pulsos que la NP puede seguir (resolver) (Christensen & Hildebrand, 1997). En algunas NPs las respuestas trifásicas se dan sólo cuando se estimula con una mezcla de olor, y no con olores únicos (Christensen & Hildebrand, 1997). En este caso, algún componente de la mezcla genera despolarización mientras que otro componente genera una breve hiperpolarización de manera que sólo cuando se estimula con la mezcla de olor correcta (y esto incluye las con-

centraciones relativas correctas entre constituyentes de la mezcla) las NPs son capaces de responder (Christensen & Hildebrand, 1997). En otros casos, un compuesto único puede evocar este patrón de respuesta (Guerenstein *et al.*, 2004), probablemente involucrando un complejo circuito neuronal. En todo caso, la corta fase inhibitoria de la respuesta de NPs, mediada por NLs, es fundamental para poder responder a estimulación intermitente, lo cual al menos en algunos insectos es fundamental para evocar comportamiento de orientación (Vickers & Baker, 1994).

Las NLs cumplirían además otras funciones. Las interacciones inhibitorias interglomerulares de las que participan las NLs que promueven la sincronización de disparos de PA en NPs, por medio de breves inhibiciones a una red de NPs, de manera periódica y simultáneamente. Así, cuando se estimula con una mezcla de olor adecuada, se sincronizan los PA de NPs dentro de un mismo glomérulo y de NPs de glomérulos diferentes involucrados en la misma respuesta (Lei *et al.*, 2002). Esta sincronización resulta en una acentuación de la representación del estímulo olfativo. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que la actividad del LA esta modulada por “neuromoduladores” como las aminas biogénicas serotonina y octopamina. Los factores relacionados con la neuromodulación incluyen ritmos circadianos ya que la sensibilidad del sistema está regulada por estos ritmos a través de estas aminas (Homberg & Muller, 1999; Dacks *et al.*, 2009).

La representación funcional diferencial de distintos olores parece mantenerse o incluso acentuarse en los centros de procesamiento superiores de olfato del proto cerebro, los cuerpos pedunculados y el cuerno lateral (Ignell *et al.*, 2010). Se cree que los cuerpos pedunculados están involucrados en la formación de memoria olfativa (Dubnau *et al.*, 2001). El cuerno lateral estaría relacionado con la integración multimodal de información. Este suele mostrar dimorfismo sexual y se asocia con comportamiento sexual (Jefferis *et al.*, 2007). Aparte de la información sobre feromonas sexuales, el resto de la información olfativa (p. ej. sobre comida) está relativamente mezclada en el cuerno lateral, espacialmente hablando. Sin embargo, se cree que esta “mezcla” (superposición) en la representación de olores se debe a que las representaciones en esta zona están segregadas de acuerdo con su función biológica y no a características químicas de los olores (Jefferis *et al.*, 2007).

Métodos en fisiología olfativa

Existen diferentes técnicas para el estudio de la fisiología del sistema olfativo a nivel periférico y a nivel central. Entre los métodos empleados a nivel periférico se cuenta el electroantenograma (EAG) y los registros de sésulo único (RSU), ambas técnicas han sido abordadas previamente (Capítulo 1 de este libro).

Los registros electrofisiológicos a nivel periférico permiten identificar con relativa facilidad los constituyentes naturales de una mezcla de olor que los insectos son capaces de detectar, es decir, los compuestos “activos”. Esta identificación sería extremadamente difícil, si no imposible, con ensayos de comportamiento. Sin embargo,

es posible que mediante registros a nivel central sea posible lograr identificar algunos compuestos. Una desventaja de la identificación de compuestos activos mediante registros periféricos consiste en que se deben estudiar todos los tipos de NROs (dentro de distintos tipos de sésulos) para descartar respuesta a un cierto compuesto o para conocer la totalidad de compuestos detectados.

Un método molecular, *in vitro*, elegante para identificar los ligandos a que se une un RO en particular consiste en remover el RO original de una NRO específica (ahora convertida en una “neurona vacía”) y reemplazarlo con el RO, exógeno a estudiar (Dobritsa *et al.*, 2003; Hallem *et al.*, 2004). Al realizar registros electrofisiológicos de la “neurona vacía” con el RO exógeno adicionado, se puede no sólo estudiar los ligandos a que se une el RO exógeno, sino también entender mejor el papel de las PEOs y PNSMs. Por otro lado, para estudiar los ligandos preferenciales de los ROs en las NROs, es común acoplar la preparación electrofisiológica a un cromatógrafo de gases (CG) donde, luego de inyectar un extracto natural de una mezcla de olor relevante en el cromatógrafo, los olores individuales alcanzan la preparación de uno en uno (Guerenstein & Guerin, 2001).

Los registros a nivel central son más sensibles debido a convergencia de información (véase la subsección Nivel de SNC), y potencialmente también pueden permitir identificar olores individuales más fácilmente que en el caso de registros periféricos. Sin embargo, esta convergencia de información también da lugar a integración y procesamiento de la misma, lo cual puede resultar, por ejemplo, en neuronas que responden a mezclas de olores y no a olores individuales. Por otro lado, estos registros permiten estudiar las bases del procesamiento de información olfativa y la generación de comportamiento olfativo.

Los métodos de registro a nivel central incluyen el registro intracelular, registro multicanal y registro de imágenes. En el registro intracelular el electrodo de registro, obtenido al estirar un capilar de vidrio con un sofisticado “estirador”, es insertado dentro de una neurona, con frecuencia a nivel del axón. Para lograr esto, el diámetro de la punta del electrodo debe ser menor a un micrómetro. La preparación debe estar constantemente bañada en una solución que simule la hemolinfa, mientras que el electrodo se llena con una solución salina, con frecuencia adicionada con un colorante (Christensen & Hildebrand, 1987; Guerenstein *et al.*, 2004). Luego de estudiar la fisiología de la neurona, es posible teñir la neurona en estudio inyectando el colorante dentro de ella. Esto permite correlacionar aspectos fisiológicos con morfológicos. Usualmente los amplificadores para registro intracelular vienen provistos de un sistema que ayuda a “impeler” (penetrar) la neurona y otro sistema para inyectar el colorante. Esta técnica permite un análisis detallado de neuronas individuales en estudio pero tiene como desventajas su dificultad técnica y la relativa inestabilidad de los registros. Cuando las neuronas a estudiar son muy pequeñas, lo más indicado es utilizar registros de “patch-clamp” en célula entera, lo cual, a diferencia del registro intracelular, permite con relativa facilidad registrar el soma neuronal (Sakmann & Neher, 1995).

El registro multicanal es un método de registro extracelular que, usando arreglos de multielectrodos de silicio, permite obtener señales eléctricas (p. ej. PA) de muchas neuronas simultáneamente (Pawlowski *et al.*, 2005), con lo cual se puede comprender mejor cómo un olor es representado en una red de neuronas, por ejemplo, en el LA. Por ejemplo, en el LA de la polilla *Manduca sexta* es posible introducir al menos 16 canales de registro (Lei *et al.*, 2004). Una ventaja de este método es que, como es muy estable, permite registros por tiempos prolongados, lo cual hace posible experimentos en que se estudian cambios en la preparación, como por ejemplo, debido a aprendizaje o a manipulaciones farmacológicas.

Los métodos de estudio de imágenes ópticas miden la actividad neuronal usando luz. Esto se logra gracias a colorantes que cambian sus propiedades ópticas en función de alguna variable metabólica, como por ejemplo, la concentración de ciertos iones o moléculas, o un cambio en el potencial de membrana. Como en el caso de los registros de multicanal, una ventaja de estos métodos es la medición simultánea de la actividad neuronal en diferentes regiones, por ejemplo, del LA. De esta manera, se puede analizar el patrón combinatorio de glomérulos activados por un olor determinado. En estos métodos el colorante puede ser aplicado en la solución con que se baña a la preparación, puede ser introducido en grupos de neuronas (p. ej., NPs) o en neuronas individuales (incluso usando ingeniería genética). El colorante puede ser sensible, por ejemplo, a concentraciones de Ca^{+2} o también a cambios del voltaje de membrana.

Conclusiones y perspectivas

Mucho se ha avanzado en los últimos 30 años en la comprensión de la morfología y función del sistema olfativo de los insectos. Los recientes progresos en el campo de la biología molecular están llevando a una comprensión detallada de los procesos de transporte de las moléculas de olor, de recepción a nivel de membrana y generación de impulsos nerviosos (traducción de señal). También se conoce actualmente cuáles son los olores que activan muchos de los receptores de olor de varios insectos modelo. Por otro lado, se han comenzado a comprender muchos aspectos del procesamiento de información olfativa en el cerebro. Esto es de gran interés para comprender cómo un cerebro en miniatura procesa información compleja, lo cual tiene aplicación, por ejemplo, en robótica. Esto conduce también a entender las bases neuronales del comportamiento olfativo. Finalmente, el conocimiento adquirido tanto a nivel de sistema olfativo periférico como central, cada vez está contribuyendo más en el desarrollo de métodos de manipulación del comportamiento de insectos perjudiciales. Por ejemplo, conocer cuáles son los olores que un determinado sistema olfativo detecta, abre la posibilidad al desarrollo de olores simples atrayentes. Más aún, al conocer las conexiones neuronales en los circuitos del LA se pueden inferir combinaciones de olores que participan de una respuesta en particular, lo cual daría lugar a potentes efectos atrayentes, simulando estímulos naturales.

Agradecimientos

Fabio Guidobaldi agradece al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina, por su apoyo a través de una beca doctoral. Pablo Gurenstein agradece a CONICET, Universidad Nacional de Entre Ríos, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, y Fundación Bunge y Born, Argentina, por su apoyo financiero.

Referencias

- ABUIN, L., BARGETON, B., ULBRICH, M. H., ISACOFF, E. Y., KELLENBERGER S., & BENTON, R. 2011. Functional architecture of olfactory ionotropic glutamate receptors. *Neuron* 69: 44-60.
- AI, M., MIN, S., GROSJEAN, Y., LEBLANC, C., BELL, R., BENTON, R., & SUH G. S. B. 2010. Acid sensing by the *Drosophila* olfactory system. *Nature* 468: 691-696.
- ALTNER, H. 1977. Insect sensillum specificity and structure: an approach to a new typology. *Olfaction Taste* 6: 295-303.
- ALTNER, H., & PRILLINGER, L. 1980. Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo-, and hygroreceptors and its functional significance. *Inv. Rev. Cytol.* 67: 69-139.
- ANTON, S., & HANSSON, B. S. 1994. Central processing of sex pheromone, host odour, and oviposition deterrent information by interneurons in the antennal lobe of female *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Comp. Neurol.* 350: 199-214.
- ANTON, S., & HOMBERG, U. 1999. Antennal lobe structure, pp. 97-124 *en* Hansson, B. S. (ed.), *Insect Olfaction*. Springer, Berlin.
- BENTON, R., VANNICE, K. S., & VOSSHALL, L. B. 2007. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature* 450: 289-293.
- BENTON, R., VANNICE, K. S., GOMEZ-DIAZ, C., & VOSSHALL, L. B. 2009. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell* 136: 149-162.
- BOHBOT, J., LU, T., & ZWIEBEL, L. J. 2010. Molecular regulation of olfaction in mosquitoes, pp. 17-38 *en* Takken, W., & Knols, B. G. J. (eds.), *Olfaction in Vector-Host Interactions*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
- BUCK, L., & AXEL, R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175-187.
- CHAPMAN, R. F. 1998. *The Insects. Structure and function*, 4^o ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- CHRISTENSEN, T. A., & HILDEBRAND, J. G. 1987. Male-specific, sex pheromone-selective projection neurons in the antennal lobes of the moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A* 160: 553-569.
- CHRISTENSEN, T. A., & HILDEBRAND, J. G. 1988. Frequency coding by central olfactory neurons in the sphinx moth *Manduca sexta*. *Chem. Senses* 13: 123-130.
- CHRISTENSEN, T. A., & HILDEBRAND J. G. 1997. Coincident stimulation with pheromone components improves temporal pattern resolution in central olfactory neurons. *J. Neurophysiol.* 77: 775-781.
- CHRISTENSEN, T. A., WALDROP, B. R., HARROW, I. D., & HILDEBRAND, J. G. 1993. Local interneurons and information processing in the olfactory glomeruli on the moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A* 173: 385-399.
- CHRISTENSEN, T. A., WALDROP, B. R., & HILDEBRAND, J. G. 1998. Multitasking in the olfactory system: context-dependent responses to odors reveal dual GABA-regulated coding mechanisms in single olfactory projection neurons. *J. Neurosc.* 18: 5999-6008.

- CHRISTENSEN, T. A., LEI, H., & HILDEBRAND, J. G. 2003. Coordination of central odor representations through transient, non-oscillatory synchronization of glomerular output neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11076-11081.
- CLYNE, P. J., WARR, C. G., FREEMAN, M. R., LESSING, D., KIM, J., & CARLSON, J. R. 1999. A novel family of divergent seven transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron* 22: 327-338.
- COUTO, A., ALENIUS, M., & DICKSON, B. J. 2005. Molecular, anatomical, and functional organization of the *Drosophila* olfactory system. *Curr. Biol.* 15: 1535-1547.
- DACKS, A. M., GREEN, D. S., ROOT, C. M., NIGHORN, A. J. & WANG, J. W. 2009. Serotonin modulates olfactory processing in the antennal lobe of *Drosophila*. *J. Neurogenet.* 23: 366-377.
- DALY, K., CHRISTENSEN, T. A., LEI, H., SMITH, B., & HILDEBRAND, J. G., 2004. Learning modulates the ensemble representations for odors in primary olfactory networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 10476-10481.
- DE BELLE, J. S., & KANZAKI, R. 1999. Protocerebral olfactory processing, pp. 243-281, *en* Hansson, B. S. (ed.), *Insect Olfaction*. Springer-Verlag, Berlin.
- DE BRUYNE, M., CLYNE, P. J. & CARLSON J. R. 1999. Odor coding in a model olfactory organ: the *Drosophila* maxillary palp. *J. Neurosci.* 19: 4520-4532.
- DE BRUYNE, M., FOSTER, K., & CARLSON, J. R. 2001. Odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron* 30: 537-552.
- DIEHL, P. A., VLIMANT, M., & GUERENSTEIN, P. 2003. Ultrastructure and receptor cell responses of the antennal grooved peg sensilla of *Triatoma infestans* (Hemiptera : Reduviidae). *Arthrop. Struct. Dev.* 31: 271-285.
- DOBRI TSA, A. A., VAN DER GOES VAN NATERS W., WARR, C. G., STEINBRECHT, R. A., & CARLSON, J. R. 2003. Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron* 37: 827-841.
- DUBNAU, J., GRADY, L., KITAMOTO, T., & TULLY, T. 2001. Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* 411: 476-480.
- FRENCH, A. S., TORKKELI, P. H. & SCHUCKEL, J. 2011. Dynamic characterization of *Drosophila* antennal olfactory neurons indicates multiple opponent signaling pathways in odor discrimination. *J. Neurosci.* 31: 861-869.
- GALIZIA, C. G., & ROESSLER, W. 2010. Parallel olfactory systems in insects: Anatomy and function. *Annu. Rev. Entomol.* 55: 399-420.
- GALIZIA, C. G. & SACHSE, S. 2010. Odor coding in insects. pp. 35-70 *en* Menini, A. (ed.), *The Neurobiology of Olfaction*. CRC Press, Boca Raton.
- GALIZIA, C. G., MCILWRATH, S. L., & MENZEL, R. 1999. A digital three-dimensional atlas of the honeybee antennal lobe based on optical sections acquired by confocal microscopy. *Cell Tissue Res.* 295: 383-394.
- GUERENSTEIN, P. G., & GUERIN, P. M. 2001. Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. *J. Exp. Biol.* 204: 585-597.
- GUERENSTEIN, P. G., & HILDEBRAND, J. G. 2008. Roles and effects of environmental carbon dioxide in insect life. *Annu. Rev. Entomol.* 53: 161-178.
- GUERENSTEIN, P. G., CHRISTENSEN, T. A., & HILDEBRAND, J. G. 2004. Sensory processing of ambient CO₂ information in the brain of the moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol A* 190: 707-725.
- HALLEM, E., FOX, A. N., ZWIEBEL, L. J., & CARLSON, J. R. 2004. A mosquito odorant receptor tuned to a component of human sweat. *Nature* 427: 212-213.

- HANSSON, B. S., & CHRISTENSEN, T. A. 1999. Functional characteristics of the antennal lobe, pp. 126-157, en Hansson, B. S. (ed.), *Insect Olfaction*. Springer, Berlin.
- HEKMAT-SCAFE, D. S., STEINBRECHT, R. A., & CARLSON, J. R. 1997. Coexpression of two odorant-binding protein homologs in *Drosophila*: implications for olfactory coding. *J. Neurosci.* 17: 1616-1624.
- HILDEBRAND, J. G. 1996. Olfactory control of behaviour in moths: central processing of odor information and the functional significance of olfactory glomeruli. *J. Comp. Physiol. A* 178: 5-19.
- HOMBERG U. AND MÜLLER U. 1999. Neuroactive substances in the antennal lobe, pp. 182-204 en Hansson, B. S. (ed.), *Insect Olfaction*. Springer, Berlin.
- IGNELL, R., SENGUL, M., HILL, S., & HANSSON, B. 2010. Odour coding and neural connections, pp 63-90, en Takken W., & Knols, B. G. J. (eds.), *Olfaction in Vector-Host Interactions*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
- JEFFERIS, G. S., POTTER, C. J., CHAN, A. M., MARIN, E. C., ROHLFING, T., MAURER, C. R., & LOU, L. 2007. Comprehensive map of *Drosophila* higher olfactory centers: spatially segregated fruit and pheromone representation. *Cell* 128: 1187-1203.
- JONES, W. D., CAYIRLIOGLU, P., GRUNWALD KADOW, I., & VOSSHALL, L. B. 2007. Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in *Drosophila*. *Nature* 445: 86-90.
- KAISSLING, K-E. 1971. Insect olfaction, pp. 351-431, en Beidler L. M. (ed.), *Handbook of Sensory Physiology*, Vol. IV; *Chemical Senses*. Springer-Verlag, Berlin.
- KAISSLING, K-E. 1995. Single unit and electroantennogram recordings in insect olfactory organs, pp. 361-386, en Spielman, A. I., & Brand, J. G. (eds.), *Experimental Cell Biology of Taste and Olfaction: Current Techniques and Protocols*. CRC Press, Boca Raton.
- KAISSLING, K. 1998. Flux detectors versus concentration detectors: Two types of chemoreceptors. *Chem. Senses* 23: 99-111.
- KAISSLING, K-E., HILDEBRAND, J. G., & TUMLINSON, J. H. 1989. Pheromone receptor cells en the male moth *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 10: 273-279.
- KEIL, T. A. 1999. Morphology and development of the peripheral olfactory organs, pp. 6-44 en Hansson, B. S. (ed), *Insect Olfaction*. Springer-Verlag, Berlin.
- KENT, L. B., HARROW, I. D., QUARTARAO, P., & HILDEBRAND, J. G. 1986. An accessory olfactory pathway in Lepidoptera: the labial pit organ and its central projections in *Manduca sexta* and certain other sphinx and silk moths. *Cell Tissue Res.* 245: 237-245.
- KENT, L. B., WALDEN, K. K. O., & ROBERTSON, H. M. 2007. The Gr Family of Candidate Gustatory and Olfactory Receptors in the Yellow-Fever Mosquito *Aedes aegypti*. *Chem. Senses* 33: 79-93.
- KLEINEIDAM, C., & TAUTZ, J. 1996. Perception of carbon dioxide and other "air condition" parameters in the leaf cutting and *Atta cephalotes*. *Naturwissenschaften* 83: 566-568.
- KWON, J. Y., DAHANUKAR, A., WEISS, L. A., & CARLSON, J. R. 2007. The molecular basis of CO₂ reception in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 3574-3578.
- LEAL, W. S. 2005. Pheromone reception. *Top. Curr. Chem.* 240: 1-36.
- LEI, H., & HANSSON, B. S. 1999. Central processing of pulsed pheromone signals by antennal lobe neurons in the male moth *Agrotis segetum*. *J. Neurophysiol.* 81: 1113-1122.
- LEI, H., CHRISTENSEN, T. A., & HILDEBRAND, J. G. 2002. Local inhibition modulates odor-evoked synchronization of glomerulus-specific output neurons. *Nature Neurosc.* 5: 557-565.
- LEI, H., CHRISTENSEN, T. A., & HILDEBRAND, J. G. 2004. Spatial and temporal organization of ensemble representations for different odor classes in the moth antennal lobe. *J. Neurosc.* 24: 11108-11119.
- LU, T., QIU, Y. T., WANG, G., KWON, J. Y., RUTZLER, M., KWON, H., PITTS, R. J., VAN LOON, J. J. A., TAKKEN W., CARLSON, J. R., & ZWIEBE, L. J. 2007. Odor coding in the maxillary palp of the malaria vector mosquito *Anopheles gambia*. *Curr. Biol.* 17: 1533-1544.

- NIKONOV, A. A., & LEAL, W. S. 2002. Peripheral coding of sex pheromone and behavioral antagonist in the Japanese beetle, *Popillia japonica*. *J. Chem. Ecol.* 28: 1075-1089.
- OCHIENG, S. A., HALLBERG, E., & HANSSON, B. S. 1998. Fine structure and distribution of antennal sensilla of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *Cell Tissue Res.* 291: 525-536.
- OCHIENG, S. A., PARK, K.C., & BAKER, T. C. 2002. Host plant volatiles synergize responses of sex pheromone-specific olfactory receptor neurons in male *Helicoverpa zea*. *J. Comp. Physiol. A* 188: 325-333.
- PAWLOWSKI, V. M., CHRISTENSEN, T. A., LEI, H., & HILDEBRAND, J. G. 2005. A primer on multichannel neural ensemble recording in insects, pp. 393-415, *en* Christensen T. (ed.), *Methods in Insect Sensory Neuroscience*. CRC Press, Boca Raton.
- PELLETIER, J., GUIDOLIN, A., SYED, Z., CORNEL, A. J., & LEAL, W. S. 2010. Knockdown of a mosquito odorant-binding protein involved in the sensitive detection of oviposition attractants. *J. Chem. Ecol.* 36: 245-248.
- PELOSI, P., ZHOU, J.-J., BAN, L. P., & CALVELLO M. 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 1658-1676.
- REDDY, G. V. P., & GUERRERO, A. 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends Plant Sci.* 9: 253-261.
- REISENMAN C., DACKS A. & HILDEBRAND J. 2011. Local interneuron diversity in the primary olfactory center of the moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. A* 197: 653-665.
- SAKMANN, B., & NEHER E. 1995. *Single-Channel Recording*. Plenum Press, New York.
- SATO, K., PELLEGRINO, M., NAKAGAWA, T., NAKAGAWA, T., VOSSHALL, L. B., & TOUHARA, K. 2008. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* 452: 1002-1007.
- SCOTT, K., BRADY, R. JR., CRAVCHIK, A., MOROZOV, P., RZHETSKY, A., ZUKER, C., & AXEL, R. 2001. A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell* 104: 661-673.
- STOPFER, M., WEHR, M., MACLEOD, K., & LAURENT, G. 1999. Neural dynamics, oscillatory synchronization, and odour codes, pp. 163-180, *en* Hansson, B. S. (ed.), *Insect Olfaction*. Springer-Verlag, Berlin.
- SHEPHERD, G. M. 1985. Are there labeled lines in the olfactory pathway?, pp. 307-321, *en* Pfaff, D. W. (ed.), *Taste, Olfaction, and the Central Nervous System*. Rockefeller Press, New York.
- SHIELDS, V., & HILDEBRAND, J. G. 2001. Responses of a population of antennal olfactory receptor cells in the female sphinx moth *Manduca sexta* to plant-associated volatile organic compounds. *J. Comp. Physiol. A* 186: 1135-1151.
- SILBERING, A., RYTZ, R., GROSJEAN, Y., ABUIN, L., RAMDYA, P., JEFFERIS, G. S., & BENTON R. 2011. Complementary function and integrated wiring of the evolutionarily distinct *Drosophila* olfactory subsystems. *J. Neurosci.* 31: 13357-13375.
- STANGE, G., & STOWE, S. 1999. Carbon-dioxide sensing structures in terrestrial arthropods. *Microsc. Res. Tech.* 47: 416-427.
- STENGL, M., ZIEGELBERGER, G., BOEKHOFF, I., & KRIEGER J. 1999. Perireceptor events and transduction mechanisms in insect olfaction, pp. 49-66 *en* Hansson, B. S. (ed), *Insect Olfaction*. Springer-Verlag, Berlin.
- SUH, G. S. B., WONG, A. M., HERGARDEN, A. C., WANG, J. W., & SIMON, A. F. 2004. A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*. *Nature* 431: 854-859.

- THOM, C, GUERENSTEIN, P. G., MECHABER, W. L., & HILDEBRAND, J. G. 2004. Floral CO₂ cues reveal flower profitability to moths. *J. Chem. Ecol.* 30: 1285-1288.
- TODD, J. L., & BAKER, T. C. 1999. Function of peripheral olfactory organs, pp. 67-96, *en* Hansson, B. S. (ed.), *Insect Olfaction*. Springer-Verlag, Berlin.
- VICKERS, N. J., & BAKER T. C. 1994. Reiterative responses to single strands of odor promote sustained upwind flight and odor source location by moths. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5756-5760.
- VOGT, R. G., & RIDDIFORD, L. M. 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* 293: 161-163.
- VOSSHALL, L., AMREIN, H., MOROZOV, P., RZHETSKY, A., & AXEL R. 1999. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell* 96: 725-736.
- WICHER, D., SCHÄFER, R., BAUERNEFEIND, R., STENSMYR, M. C., HELLER, R., HEINEMANN, S. H., & HANSSON, B. S. 2008. *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature* 452: 1007-1012.
- YAO, C. A., IGNEILL, R., & CARLSON, J. R. 2005. Chemosensory coding by neurons in the coeloconic sensilla of the *Drosophila* antenna. *J. Neurosci.* 25: 8359-8367.
- YAO, C. A. & CARLSON, J. R. 2010. Role of G-proteins in odor-sensing and CO₂-sensing neurons in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 30: 4562-4572.