



Universidad Nacional Autónoma de  
México

---

**Instituto de Fisiología Celular**

**Regeneración Anatómica y Funcional de Circuitos  
Glomerulares en el Sistema Olfatorio**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**Eduardo Blanco Hernández**

Asesor de Tesis: Román Vidal Tamayo Ramírez

México DF, 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	4
<b>Resumen</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	6
<b>1 Introducción</b> .....	7
<b>1.1 El sistema olfatorio</b> .....	8
1.1.1 El epitelio olfatorio.....	9
1.1.2 El bulbo olfatorio.....	12
1.1.3 La corteza olfatoria.....	14
<b>1.2 Organización funcional del sistema olfatorio</b> .....	16
<b>1.3 Formación y mantenimiento de los circuitos glomerulares</b> .....	19
<b>1.4 Regeneración del sistema olfatorio</b> .....	22
1.4.1 Metimazol como agente toxico del epitelio olfatorio.....	25
<b>5 Planteamiento del Problema</b> .....	26
<b>6 Hipótesis</b> .....	27
<b>7 Objetivos</b> .....	28
<b>8 Resultados</b>	
<b>8.1 Parte 1</b>	
8.1.1 Recuperación anatómica.....	29
8.1.2 Regeneración del circuito M72.....	30
8.1.3 Regeneración de neuronas M72 en el epitelio olfatorio.....	31
8.1.4 Localización del circuito M72 regenerado.....	32
8.1.5 Regeneración del circuito I7.....	35
8.1.6 Formación de los circuitos glomerulares después de la regeneración....	36

## 8.2 Parte 2

8.2.1 Recuperación funcional después de la regeneración .....	39
8.2.2 Discriminación de odorantes preferentes a M72 e I7.....	39
8.2.3 Respuesta innata a odorantes después de la regeneración.....	41
<b>9 Discusión .....</b>	<b>42</b>
9.1 Regeneración de circuitos glomerulares específicos.....	44
9.2 Recuperación funcional.....	46
<b>10 Materiales y Métodos</b>	
10.1 Animales .....	50
10.2 Degeneración del epitelio olfatorio y tinción con X.gal.....	50
10.3 Inmunohistoquímica.....	50
10.4 Conteo de células.....	51
10.5 Análisis de la posición de glomérulos laterales .....	51
10.6 Pruebas conductuales .....	51
10.7 Análisis estadístico.....	52
<b>11 Referencias.....</b>	<b>53</b>
<b>12 Apéndice .....</b>	<b>57</b>
Odor Memory Stability after Olfactory Bulb Reinnervation	

## Abreviaturas

<b>OE</b>	Epitelio olfatorio
<b>OSN</b>	Neuronas sensoriales olfatorias
<b>LP</b>	Lámina propia
<b>OB</b>	Bulbo olfatorio
<b>OR</b>	Receptor a odorantes
<b>MTZ</b>	Metimazol
<b>LacZ</b>	Gen que codifica a la enzima $\beta$ -galactosidasa
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>TMT</b>	Trimetil tiazolina
<b>SEM</b>	Error estándar
<b>X-gal</b>	<u>B</u> romo- <u>c</u> loro- <u>i</u> ndolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b>cAMP</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>i.p</b>	Inyección intraperitoneal

## Resumen

La neurogénesis en organismos adultos es un campo de intenso estudio en las neurociencias. Su investigación tiene como objetivo futuro poder reparar circuitos neuronales dañados. En mamíferos el epitelio olfatorio es de gran interés debido a sus capacidades de regeneración, epitelial y axonal de las neuronas sensoriales olfatorias. La función que cumplen las neuronas sensoriales y su organización en el bulbo olfatorio lo hace un modelo ideal para evaluar la recuperación funcional después de la regeneración. Estudios previos han mostrado el gran potencial de regeneración y recuperación funcional después de una lesión en el epitelio olfatorio, sin embargo, se ha descrito que los circuitos glomerulares en el bulbo olfatorio pierden su organización después de la reinervación, lo que lleva a la incapacidad de realizar tareas olfatorias aprendidas previamente. Esto sugiere que la organización de los circuitos glomerulares está directamente relacionada con el proceso de identificación de los olores.

En el presente trabajo evaluamos la recuperación anatómica y funcional de los circuitos glomerulares M72 e I7 en ratones, utilizando para ello el agente tóxico metimazol, que se sabe provoca degeneración generalizada en el epitelio olfatorio, sin afectar las células troncales del epitelio y a la estructura que le da soporte a los axones de las neuronas sensoriales. En estas condiciones mostramos que después de una lesión extensiva del epitelio olfatorio es posible observar la recuperación de la organización glomerular en el bulbo olfatorio y con ella la de conductas olfatorias aprendidas e innatas.

Estos datos no solo revelan que el sistema olfatorio es capaz de regenerar circuitos específicos también demuestran que la organización glomerular es determinante en el proceso de identificación y posiblemente percepción de los olores.

## **Abstract**

Neurogenesis in adult organism is an intense research area in neuroscience. The main goal of neurogenesis research is to repair specific neural circuit in degenerative diseases or stroke. In mammals, the olfactory epithelium is of great interest as it possesses tissular and neuronal regenerative potential. The specific function of the olfactory sensory neurons and the fine organization within the olfactory bulb allows the exploration of functional recovery after regeneration. Previous studies have shown that olfactory epithelia can recover after diverse insults, although the organization of glomerular circuits in the olfactory bulb is disrupted. The functional consequence is loss of previously learned olfactory abilities. This observation supports the hypothesis that glomerular organization is closely involved in the identification process of odor identity.

The present work studied the anatomical and functional recovery of M72 and I7 glomerular circuits after degeneration induced by methimazole, a toxin that has been shown to elicit generalized cellular degeneration within the olfactory epithelium, without perturbing the stem cells of the sensory epithelia and the underlying tissue that support axon navigation. Under this condition, we observed anatomical recovery of specific circuits and recovery of learned discriminatory abilities, our data, also show that the odor innate responses are recovered. Our data show for the first time that the olfactory system is capable of regenerating specific circuits and underscore the importance of glomerular organization for odorant identification.

## **1. Introducción**

La producción de neuronas en el sistema nervioso adulto es un fenómeno que se encuentra bien documentado en diversos organismos a lo largo de la evolución, incluyendo vertebrados (Barker et al., 2011; Ferretti, 2011). Desde su descubrimiento en mamíferos ha sido un problema de intenso estudio en las neurociencias ya que ha permitido la investigación de los procesos que permiten a nuevas neuronas integrarse a circuitos ya existentes. Lo que abre la posibilidad, en un futuro, de restablecer la función neuronal cuando grupos o tractos de neuronas se ven afectados debido a enfermedades neurodegenerativas o daño directo al tejido nervioso. En roedores se sabe de tres sitios donde es posible observar la generación de neuronas en el adulto: la zona subventricular en la pared de los ventrículos laterales, el giro dentado en el hipocampo y el epitelio olfatorio (OE) en el techo de la cavidad nasal (Figura 1). El OE presenta dos características importantes: por un lado se observa el proceso de neurogénesis de las neuronas sensoriales olfatorias (OSN) y por otro, la proyección e innervación de circuitos particulares en el bulbo olfatorio (OB) por las nuevas neuronas. Estas características lo vuelven un modelo ideal para estudiar procesos regenerativos en mamíferos. Un aspecto adicional es que la organización de los circuitos neuronales entre el OE y el OB tiene un papel muy importante en el proceso de percepción olfativa por lo que es posible evaluar funcionalmente la recuperación después de una lesión. De esta manera el estudio de la regeneración de las OSN nos permite abordar de manera simultánea la regeneración de circuitos específicos y el papel de la organización de éstos, en el proceso que lleva a la percepción olfativa.



En el presente trabajo estudiamos el potencial regenerativo del epitelio olfatorio en ratón siguiendo la recuperación anatómica de circuitos glomerulares específicos y evaluamos la recuperación funcional después de la reinervación sensorial del OB.

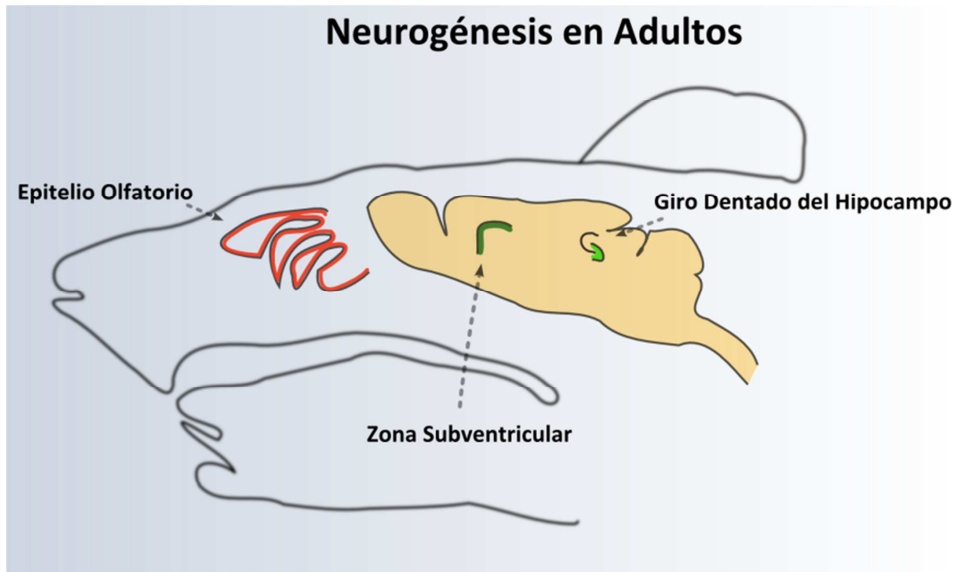


Figura 1. Neurogénesis en mamíferos adultos. Se destaca la ubicación de las diferentes zonas que producen neuronas en la etapa adulta: Epitelio olfatorio (OE), Zona subventricular y el giro dentado del hipocampo.

### 1.1 El sistema Olfatorio

El sistema olfatorio es el encargado de procesar la información odorífera del medio. Es muy importante para la vida de los organismos ya que les permite encontrar comida y reconocer pareja y posibles amenazas (Munger et al., 2008). El sistema olfatorio está compuesto por varios subsistemas: el sistema vomeronasal, el sistema trigeminal y el denominado principal. Este último se compone principalmente por el OE donde se encuentran las OSN que reconocen directamente las moléculas volátiles, el OB donde se establece el primer relevo sináptico y se

lleva a cabo el procesamiento inicial de la información y finalmente la corteza olfatoria (Figura 2), a continuación se mencionan sus características.

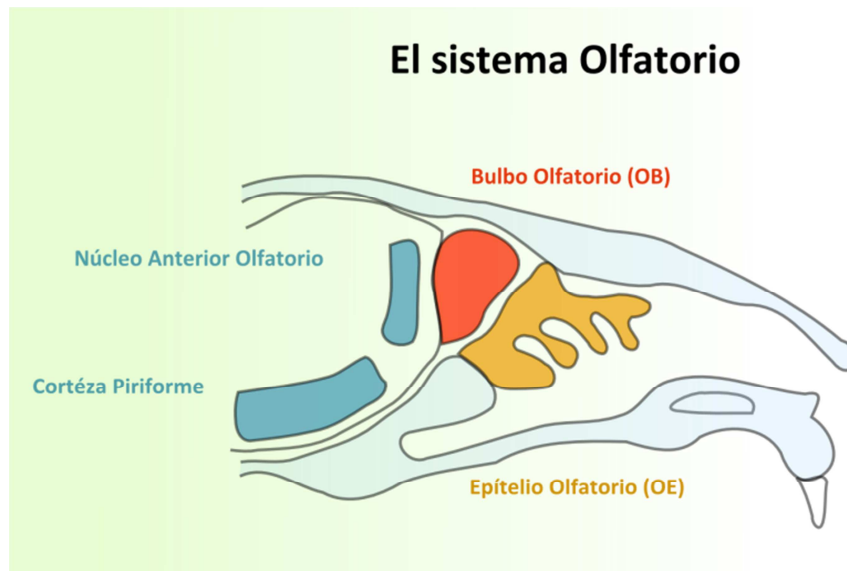


Figura 2. Componentes del sistema olfatorio principal. Diagrama que muestra algunos de los principales componentes del sistema olfatorio como el OE, OB y la corteza olfatoria. Por claridad únicamente se muestra el núcleo anterior olfatorio y la corteza piriforme.

### 1.1.1 Epitelio olfatorio

El epitelio olfatorio se encuentra en el techo de la cavidad nasal adherido a una estructura cartilaginosa denominada “cornete” (Figura 3A). La organización celular en el OE se encuentra pseudoestratificada, compuesta por células sustentaculares, glándulas de Bowman, neuronas sensoriales (maduras e inmaduras), células globosas y células horizontales (Figura 3C), adheridas a una lámina basal. Por debajo de la lámina basal se encuentra la *Lamina propria* (LP) donde los axones de las OSN viajan hacia el bulbo olfatorio rodeados de células de recubrimiento (OEC) (Harkema et al., 2006; Murdoch and Roskams, 2007). El modelo más

aceptado en la actualidad es que las células globosas son las células progenitoras que recambian constantemente a las OSN, mientras las células horizontales son la población de células madre. En caso de una lesión al OE, las células horizontales son suficientes para restablecer todos los componentes del celulares del OE (Leung et al., 2007) (Figura 3C).

Las OSN son neuronas bipolares que en su dendrita apical contienen cilios, que se encuentran en contacto el aire inspirado. En los cilios se expresan los receptores a odorantes (OR) y se lleva acabo la transducción de señales que lleva al disparo de potenciales de acción en respuesta a la presencia de un odorante en la cavidad nasal (Figura 3D). Los receptores a odorantes se encuentran acoplados a proteínas G que al ser activados aumentan la concentración de cAMP a través de la adenilato ciclasa (ACIII), produciendo la apertura de un canal dependiente de nucleótidos cíclicos (CNGA2) que permite la entrada de cationes. La entrada de calcio a través de CNGA2 promueve, a su vez, la apertura de un canal de cloro (NKCC1). En las OSN el cloro sale de la célula debido que su concentración interna es alta. En su conjunto, la entrada de cationes y la salida de aniones, llevan ala despolarización de la neurona y al disparo de potenciales de acción (Wilson and Mainen, 2006) (Figura 3E).

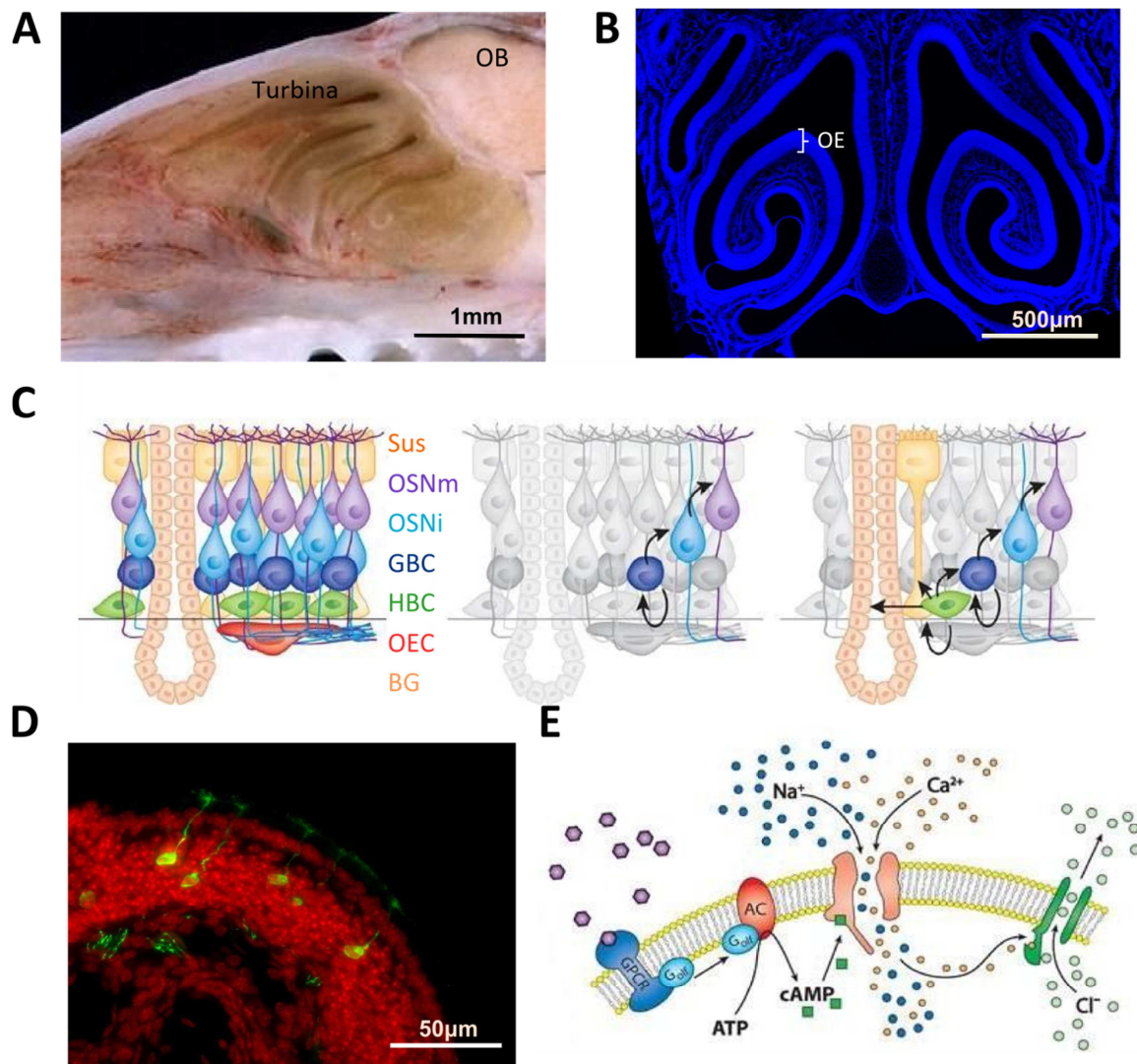


Figura 3 Epitelio olfatorio. A, Se muestra la vista lateral de un corte sagital de la cabeza de un ratón donde se observan las turbinas en la cavidad nasal y el OB en la parte más anterior del cerebro. B, Se muestra un corte coronal de las turbinas teñido con DAPI donde se aprecia su estructura plegada y el OE. C, Un diagrama donde se muestran las diferentes poblaciones que componen el epitelio olfatorio: células sustentaculares (Sus), neuronas sensoriales olfatorias maduras (OSNm), neuronas sensoriales inmaduras (OSNi), células globosas basales (GBC), células horizontales basales (HBC), células olfatorias de recubrimiento (OEC) y glándulas de de Bownman (BG) . También se esquematiza el remplazo de los distintos componentes celulares por medio de las células globosas (centro) y horizontales (derecha) (modificado de Leung et al 2007). D, Inmunohistoquímica que muestra a OSN con el receptor 17 marcadas con la proteína verde fluorescente. E, Esquema donde se resume la señalización que origina los potenciales de acción en las OSNs al activarse el receptor a odorantes.

### **1.1.2 Bulbo Olfatorio**

En el ratón, el OB se encuentra en la parte más anterior del cerebro. Su organización celular es por capas donde las más externas son la capa de nervios y la capa glomerular (Figura 4A). Los glomérulos son estructuras esféricas densamente innervadas por los axones de las OSN. Estos son las unidades de procesamiento del OB, en ellas se lleva a cabo el primer relevo sináptico de la vía olfatoria y se inicia el procesamiento de la información sensorial olfativa (Chen and Shepherd, 2005). Los glomérulos se encuentran constituidos por los axones de las OSN y de innervaciones dendríticas de interneuronas y neuronas mitrales y empenachadas, estas dos últimas constituyen la vía de salida del bulbo olfatorio hacia la corteza (Figura 4B).

Las neuronas de relevo inervan, de manera general, únicamente un glomérulo por lo que el procesamiento de la información olfatoria se lleva a cabo de manera columnar (Willhite et al., 2006) (Figura 4C). La interacción entre columnas se produce a varios niveles: por interneuronas de axón corto que comunican varios glomérulos; por un conjunto de neuronas empenachadas que llevan la información a neuronas mitrales de glomérulos dentro del mismo bulbo y también al bulbo contralateral; y por último las neuronas mitrales que hacen contacto con neuronas inhibitorias granulares por medio de sus dendritas secundarias a nivel de la capa granular (Shepherd, 2004)(Figura 4B). De manera interesante, los distintos grupos de interneuronas son susceptibles de recambio por parte de los neuroblastos que migran desde la zona subventricular y se diferencian a los diversos tipos en el OB (Lazarini and Lledo, 2011).

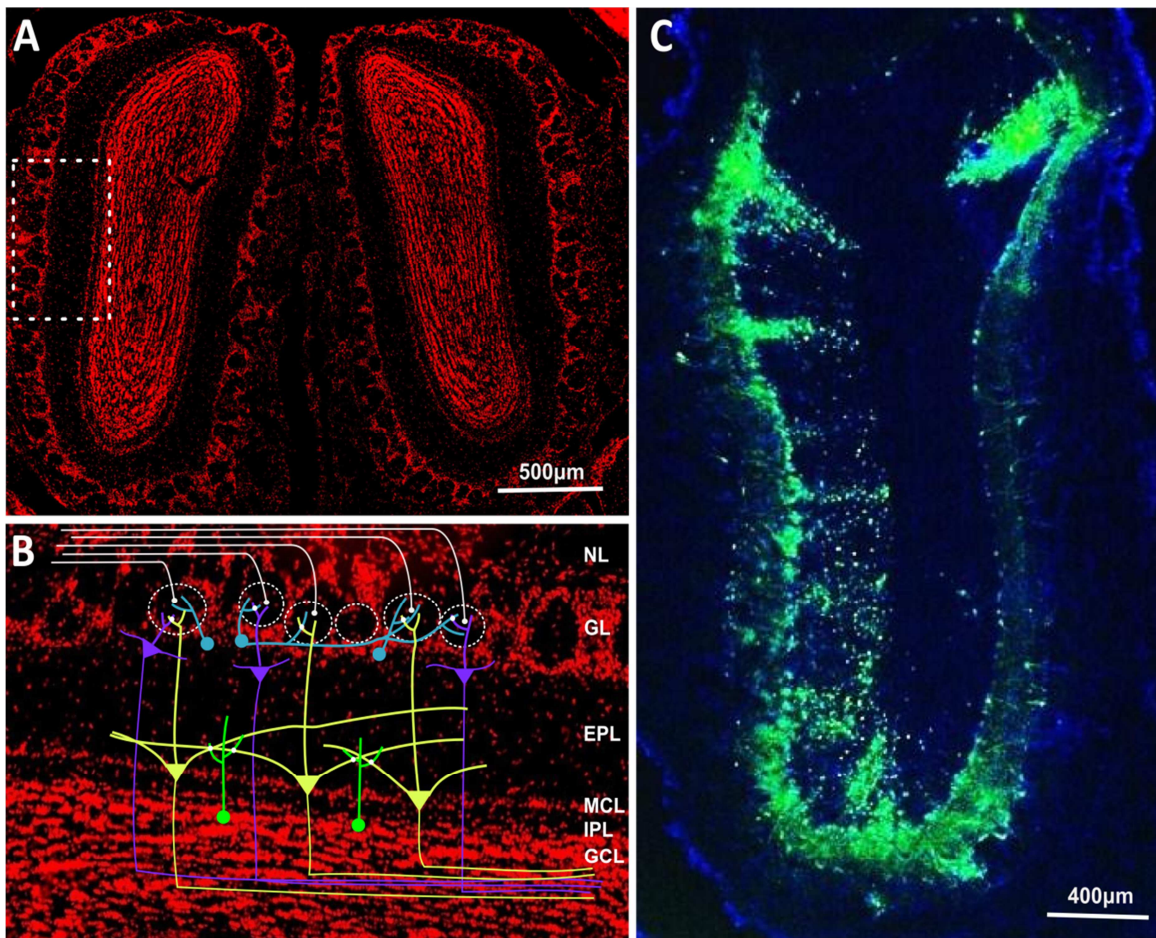


Figura 4 El Bulbo olfatorio. A, Se muestra un corte coronal de los OB de ambos hemisferios teñidos con DAPI para resaltar la organización en capas de los mismos. B, Se muestra un acercamiento del OB en la zona marcada por un recuadro en A. En este acercamiento se pueden distinguir las diferentes capas del OB: la capa de nervios (NL), la capa glomerular (GL), la capa plexiforme externa (EPL), la capa de células mitrales (MCL), la capa plexiforme interna (IPL) y la capa de células granulares (GCL). Se muestra sobrepuesto un diagrama del circuito básico: neuronas mitrales (amarillo), neuronas en penacho externas (morado), neuronas periglomerulares (azul) y células granulares (verde). C, Corte coronal del OB de un ratón transgénico donde se hace un marcado retrógrado con el pseudovirus de la rabia de los circuitos glomerulares, donde se aprecian arreglos columnares al interior del OB (modificado de Willhite et al., 2006).

### **1.1.3 Corteza olfatoria**

Una vez que los axones de las neuronas mitrales y empenachadas salen del bulbo olfatorio forman el tracto lateral olfatorio que proyecta a diversas partes del sistema nervioso, cada una de ellas se considera como corteza olfatoria sin embargo se reconoce a la corteza piriforme como la principal (Shepherd, 2004). Los axones de las neuronas mitrales y empenachadas dejan colaterales en la corteza anterior olfatoria, en la corteza piriforme, en el tubérculo olfatorio, en la amígdala y corteza prefrontal y por último inervan la corteza entorrinal en la región más posterior (Walz et al., 2006; Sosulski et al., 2011) (Figura 5A). La corteza piriforme se considera una paleocorteza ya que se encuentra constituida por tres capas, a diferencia de la neocorteza de seis (Figura 5B). Sus neuronas piramidales que dan la salida se encuentran tanto en la capa dos y tres y son dinámicamente reguladas por un conjunto de interneuronas localizadas en la región dendrítica y somática, similar a otras cortezas (Sakano, 2010; Stokes and Isaacson, 2010).

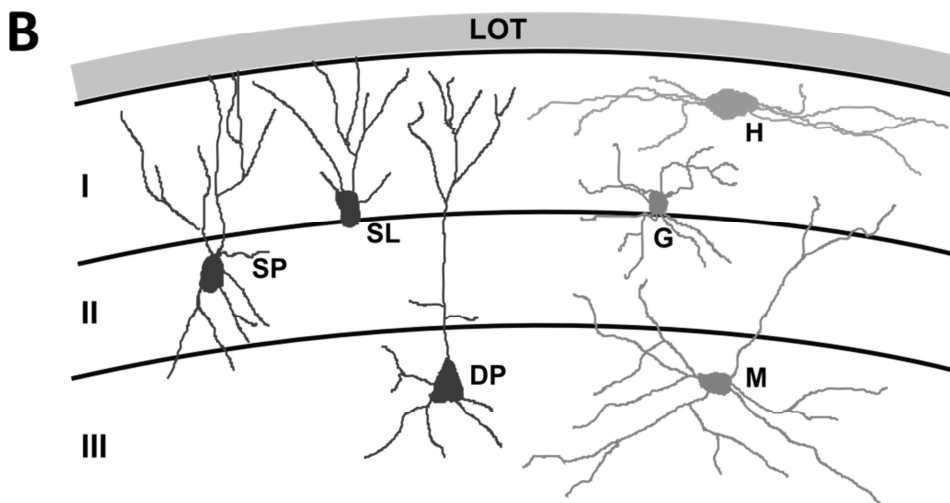
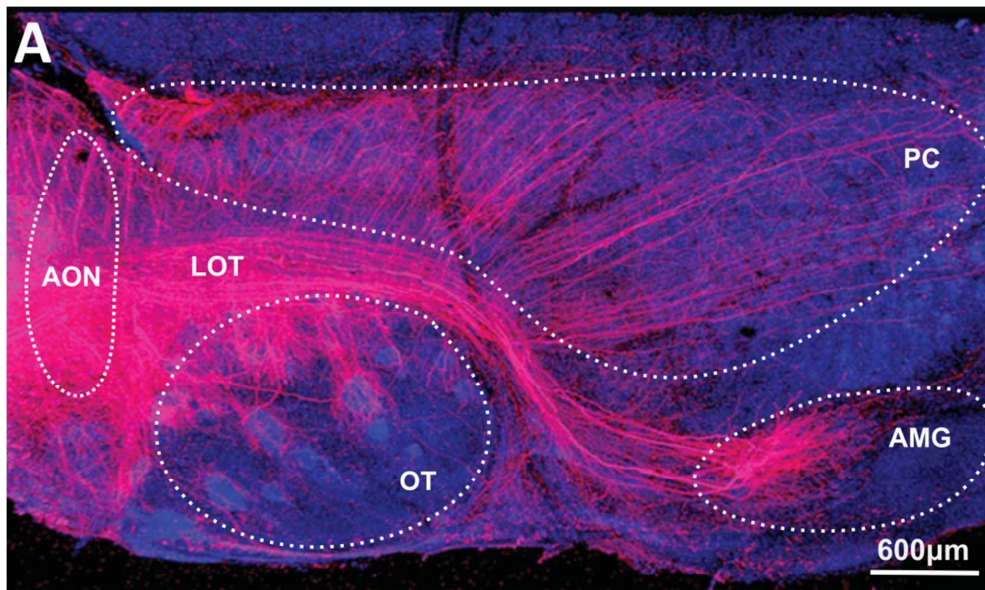


Figura 5 La corteza olfatoria. A se muestra una imagen de epifluorescencia de una sección sagital del cerebro donde se pueden observar las proyecciones de las neuronas mitrales y empenachadas identificadas con un marcador fluorescente (rojo), la marca azul es de DAPI. Como se observa los axones llegan a diferentes partes del cerebro mediante el tracto lateral olfatorio (LOT): la corteza anterior olfatoria (AON), el tubérculo olfatorio (OT), la corteza piriforme u olfatoria (PC) y la amígdala (AMG) (modificado de Sosulski et al., 2011). B, Diagrama de la organización celular de la corteza piriforme. Se ilustran por simplicidad sus componentes principales, neuronas excitatorias (gris fuerte) e interneuronas inhibitorias (gris claro). Neurona semilunar (SL), piramidal superficial (SP), piramidal profunda (DP), neurogliforme (G), horizontal (H), multipolar (H) (modificado de Shepherd, 2004).



## 1.2 Organización funcional del sistema olfatorio

La organización funcional del sistema olfatorio esta determinada en gran medida desde las conexiones sinápticas entre las OSN y las neuronas de relevo del bulbo olfatorio. Cada una de las neuronas sensoriales expresa un solo receptor a odorantes de entre una diversidad de más de 1000, codificados por diferentes genes (Mombaerts, 2001, 2004a). En el OE las diferentes poblaciones olfatorias se encuentran dispersas longitudinalmente en el eje dorso ventral (Miyamichi et al., 2005). Sin embargo las neuronas que expresan un mismo receptor viajan de manera casi conjunta y coalescen en dos glomérulos situados estereotípicamente en el bulbo olfatorio (Mombaerts et al., 1996; Potter et al., 2001; Treloar et al., 2002; Mombaerts, 2006) (Figura 6B). De esta manera cada glomérulo recibe exclusivamente la información proveniente de un receptor olfatorio y por tanto su campo receptivo se delimita por éste (Bozza et al., 2002). Los OR reconocen a diversos odorantes sin embargo, son activados preferentemente por uno en particular. Este conjunto de moléculas capaces de activar a un receptor particular constituye su campo receptivo (Araneda et al., 2000; Araneda et al., 2004; Mombaerts, 2004b). De manera similar un odorante particular, dependiendo de su concentración, activa un repertorio de OR y por tanto de glomérulos en el bulbo olfatorio. Hay entonces un conjunto de glomérulos que se activan en respuesta a un odorante particular (Johnson and Leon, 2000; Belluscio and Katz, 2001; Wachowiak and Cohen, 2001; Bozza et al., 2002; Bozza et al., 2004; Johnson and Leon, 2007) (Figura 6C). Estos mapas de activación en el bulbo olfatorio constituyen un paso importante en el procesamiento de la información olfatoria y se propone que determinan la identidad de los olores (Johnson et al., 1998; Costanzo, 2000; Uchida et al., 2000; Mori et al., 2005; Mori et al., 2006; Johnson et al., 2009). La información así, es

transmitida por conjuntos de neuronas de relevo a la corteza olfatoria. Las neuronas piramidales en la corteza reciben información sináptica de una gran cantidad de neuronas mitrales y empenachadas (Ghosh et al., 2011; Miyamichi et al., 2011; Sosulski et al., 2011). Es indispensable sin embargo, que converjan estímulos provenientes de varias neuronas de relevo para producir potenciales de acción en las neuronas piramidales (Apicella et al., 2010; Davison and Ehlers, 2011) (Figura 6D). Actualmente se ha podido determinar que un odorante produce la activación de grupos de células piramidales dispersos a lo largo de la corteza piriforme (Stettler and Axel, 2009). Sin embargo no existe hasta la fecha una organización determinada ni en la proyección de los axones del LOT ni en los grupos de neuronas piramidales que responden a un odorante específico.

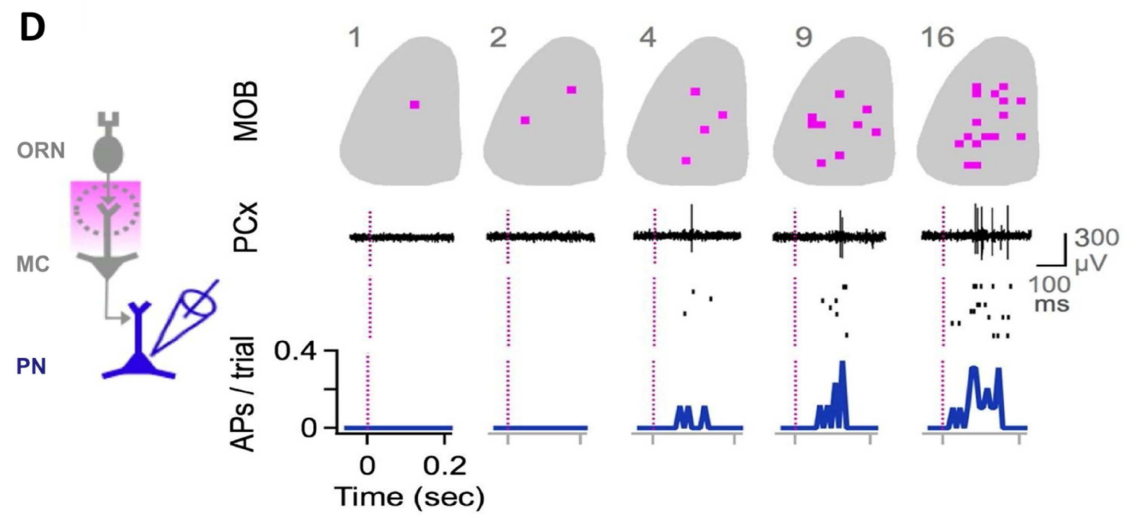
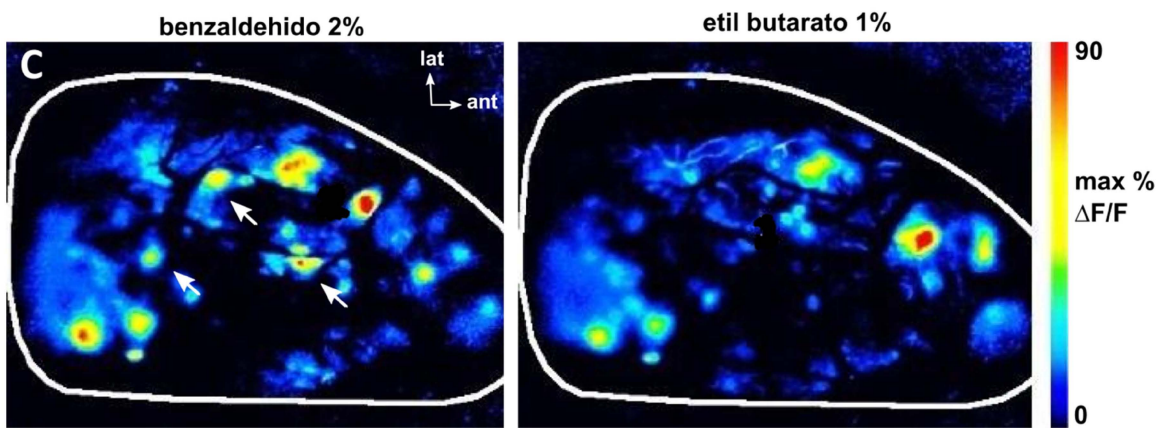
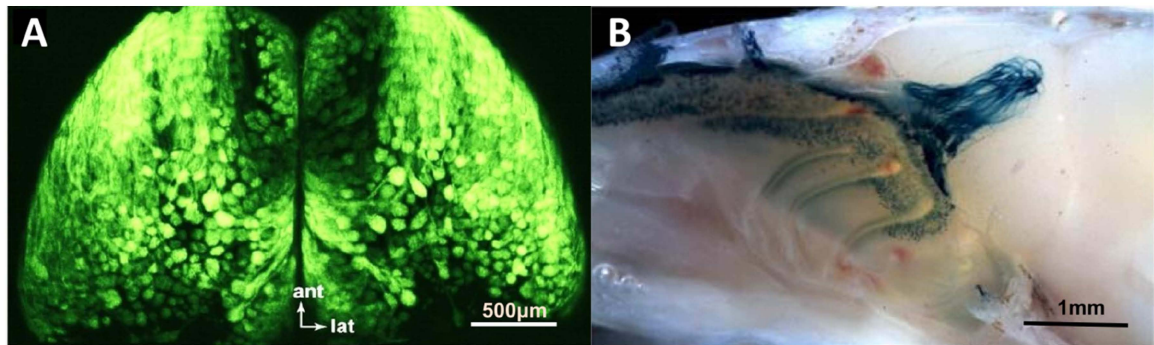


Figura 6. Organización funcional del sistema olfatorio. A, Imagen de la vista dorsal del OB de un ratón transgénico en el que todas las OSN están marcadas con GFP. Es evidente la distribución de los glomérulos a lo largo del OB (modificado de Bozza et al., 2004). B, Vista sagital de un ratón M72TLZ en el que se observan el circuito M72. Las neuronas M72 se encuentran localizadas en la región dorsal de las turbinas, sus proyecciones axónicas forman un glomérulo en la región dorsal-medial del OB (el glomérulo lateral no está accesible en la imagen). C, Imágenes de la región dorsal del OB. Las fibras sensoriales contienen un sensor de calcio que permite observar la actividad glomerular al presentar los odorantes benzaldehído (2%) o butirato de etilo (1%), la actividad se muestra como cambios de fluorescencia. Se puede observar diferencias en los “mapas glomerulares” de actividad evocada por cada uno de los odorantes (flechas, izquierda) (modificado de Carey et al., 2009). D, Registro de la actividad evocada en neuronas piramidales de la corteza piriforme. En este experimento en vivo el bulbo olfatorio es bañado con glutamato enjaulado. Un arreglo de laser estimula en puntos específicos a lo largo del OB (sombras en la parte superior). En la el diagrama se muestra el número y la localización de los estímulos realizados, nótese que al aumentar el número de estímulos aumenta la probabilidad de respuesta de las neuronas en la corteza (abajo). Se muestra también un esquema del circuito implicado en la respuesta (izquierda, neurona sensorial –ORN-, célula mitral –MC- y neurona de proyección –PN-). Bulbo olfatorio (MOB), corteza piriforme (PCx), lateral (lat), anterior (ant) (modificado de Davison et al., 2011

### **1.3 Formación y mantenimiento de los circuitos glomerulares**

Como se ha mencionado la organización de los circuitos glomerulares en el sistema olfatorio juega un papel importante en el procesamiento de la información olfatoria, de ello resulta indispensable la correcta formación y mantenimiento del mapa glomerular. Actualmente el modelo más aceptado de la formación y posicionamiento de los glomérulos toma como principal responsable al receptor a odorantes mismo. La primera evidencia acerca de su participación se observó en experimentos donde se sustituyó la secuencia de un OR particular por uno distinto, provocando un cambio drástico de la posición de ese glomérulo, que no se correspondía con la posición endógena de ninguno de los OR involucrados (Wang et al., 1998) (Figura 7A y B). Este fenómeno se explica porque cada receptor a odorantes parece generar una determinada cantidad de cAMP a través de la activación de la adenilato ciclasa, lo que

establece de alguna manera la expresión de diversas moléculas de adhesión y repulsión que se expresan en los conos axónicos de las OSN y dirigen el posicionamiento de los glomérulos (Sakano, 2010). De manera general existen dos grupos de moléculas cuya expresión depende del OR, las primeras se sugiere que se expresan en neuronas inmaduras y solo dependen de cAMP; Semaforina 3A y su receptor Eph1. Estas se encargan de la ubicación anteroposterior en el BO (Imai et al., 2006; Imai et al., 2009) (Figura 7C). Las segundas están influenciadas por la actividad eléctrica y comprenden a las moléculas Kirrel2 y 3 y Eph-A2 y ephrin-A2, que determinan de manera específica la segregación glomerular en áreas más localizadas a través de interacciones homo y heterofílicas (Serizawa et al., 2006) (Figura 7D). Por último la semaforina 3F y su receptor Nrp2 determinan la posición dorso ventral al restringir dominios dorsales y ventrales de manera temporal durante el desarrollo (Takeuchi et al., 2010): primero la región dorsal y al final la ventral, sin embargo, la expresión de estas últimas no se encuentra determinada por el OR.

Una vez que se ha formado el mapa glomerular, éste se mantiene a lo largo de la vida del organismo incluso en presencia de recambio continuo de OSN. Se sugiere que este mantenimiento es de gran importancia ya que permite conservar la percepción olfativa. En los casos donde se altera la organización glomerular por la eliminación de alguna de las moléculas guía, las alteraciones persisten en la etapa adulta. Esto sugiere que el proceso formación del mapa glomerular y el proceso por el cual los axones de remplazo navegan y se integran a glomérulos ya formados en el animal adulto es el mismo. En este sentido es posible observar la capacidad regenerativa de circuitos glomerulares asumiendo que el proceso de re-inervación sigue mecanismos similares a la generación de los glomérulos durante el desarrollo.

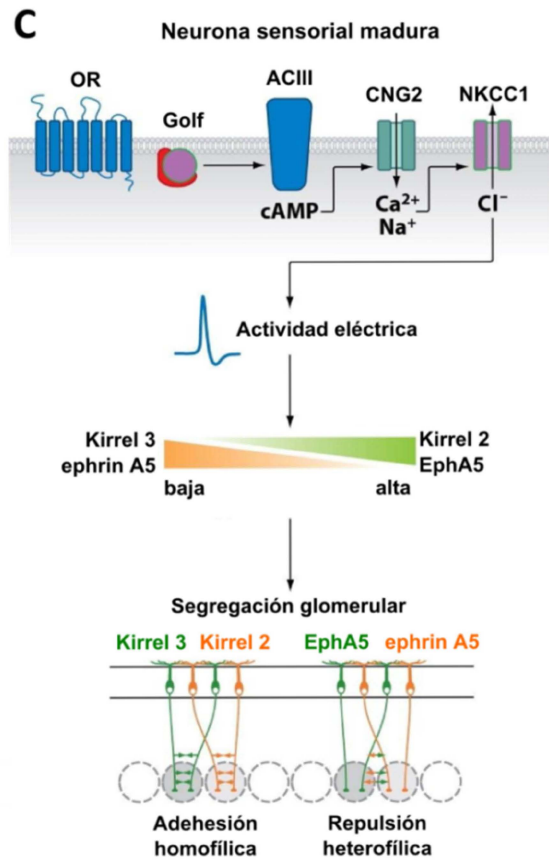
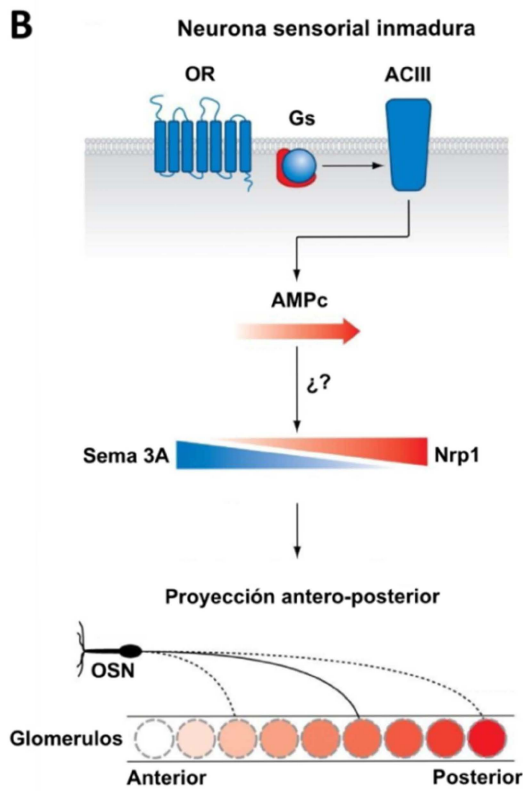
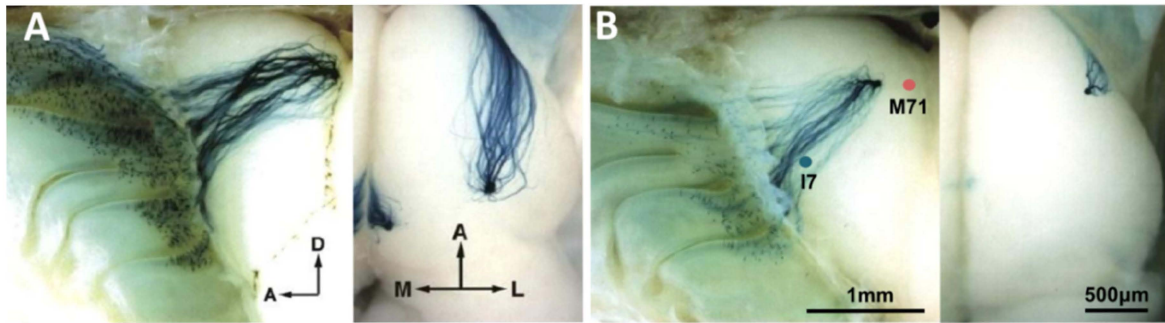


Figura 7. Formación del circuito glomerular. A, Imagen del bulbo olfatorio donde se observa el circuito M71 con LacZ. B, Cuando la secuencia codificadora del receptor M71 (panel A) es sustituida por la del receptor I7 (circuito ventral, punto azul) el glomérulo formado se ubica en una región distinta de la posición endógena del glomérulo I7 o M71 (modificado de Wang et al., 1998). B y C, Modelo del mecanismo propuesto para la formación del mapa glomerular. B, Mecanismo temprano que depende de los niveles de cAMP para la ubicación antero posterior. C, Mecanismo tardío que depende de la actividad eléctrica para la segregación glomerular a través de la adhesión homofílica y repulsión heterofílica. Anterior (A), dorsal (D), medial (M), lateral (L) (modificado de Sakano, 2010).

#### **1.4 Regeneración del sistema olfatorio**

Diversos métodos se han empleado para degenerar el epitelio olfatorio. De manera general, las diferentes estrategias pueden resumirse en tres: lesión quirúrgica, irrigación directa o administración de toxinas sistémicas (Harkema et al., 2006). Su implementación y capacidad para degenerar varían en cierto grado, sin embargo, con todas ellas es posible observar una regeneración robusta en el OE posterior a la lesión. En todos los casos la organización y los componentes celulares del OE son restablecidos después de tres o cuatro semanas (Costanzo, 1984, 1985, 1991; Burd, 1993; Schwob et al., 1995; Schwob et al., 1999; Schwob, 2002, 2005) (Figura 8A). Adicionalmente se ha observado que los axones de las OSN re-inervan el OB aunque con menor densidad la región dorsal (Schwob, 2002). De manera interesante la función del sistema olfatorio no se ve comprometida después de la regeneración; la detección y discriminación de odorantes no sufre alteraciones aparentes e incluso es posible observarlas apenas 2 semanas después de la lesión (Costanzo, 1985; Yee and Costanzo, 1995; Youngentob et al., 1997; Ducray et al., 2002; Schwob, 2005; Suzukawa et al., 2011). Sin embargo, y a pesar de la gran capacidad de regeneración del OE, la organización de los circuitos glomerulares se ve seriamente afectada (Figura 8B y C). Experimentos donde se analizó la proyección de neuronas

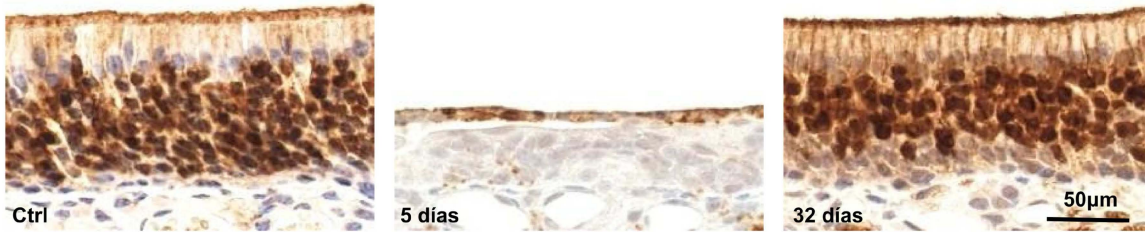
que expresan el receptor P2 (localizado antero-ventralmente) han mostrado que después de la regeneración los axones sensoriales de estas neuronas inervan gran parte del bulbo olfatorio además de formar glomérulos en sitios ectópicos, tanto en condiciones de lesión quirúrgica de los axones como al administrar diclobenil sistémicamente (Costanzo, 2000; Christensen et al., 2001; John and Key, 2003). La consecuencia funcional de la desorganización de los circuitos glomerulares es que se pierde la capacidad de realizar tareas conductuales guiadas por pistas olfatorias, aprendidas antes de la lesión en el OE (Yee and Costanzo, 1998) (Figura 8D). Estos resultados dan soporte a la hipótesis de que el mapa glomerular es determinante para el proceso de identificación de los olores (ver arriba). Sin embargo, se desconoce si la denervación de las fibras sensoriales per se tiene algún efecto en la memoria olfativa que explique este fenómeno. En todo caso la guía de los axones sensoriales es la principal afectada después de la regeneración del OE. Existen al menos tres causas que explican la incapacidad de las OSN para restablecer circuitos específicos: primero, después de una lesión quirúrgica se genera una extensa cicatriz glial que interfiere el paso de los axones hacia el bulbo olfatorio, lo que afecta su proceso de navegación; segundo, la mayoría de las toxinas empleadas, e incluso la irrigación de detergentes, causa daño en la LP, donde los axones se empaquetan y viajan hacia el OB [Se ha demostrado recientemente que este proceso es crucial en la formación de los circuitos glomerulares (Imai et al., 2009)], por último se sugiere que el contexto en el que se desarrollan los circuitos glomerulares es suficientemente diferente en el adulto como para observar la regeneración de circuitos específicos.

En este sentido y suponiendo que los mecanismos de formación del mapa glomerular están presentes en el adulto, es importante determinar si en una condición que mantenga la



integridad de la LP y no se produzca cicatriz glial es posible observar la regeneración del mapa glomerular y de esta manera investigar el papel funcional que tiene en la percepción olfatoria.

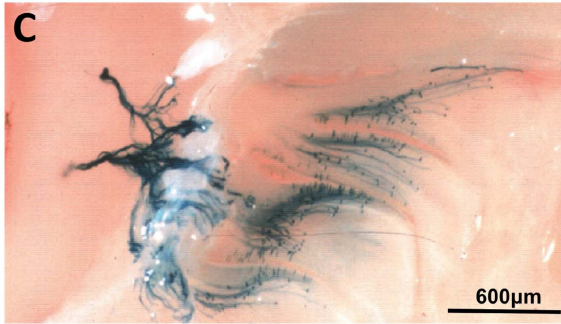
**A**



**B**



**C**



**D**

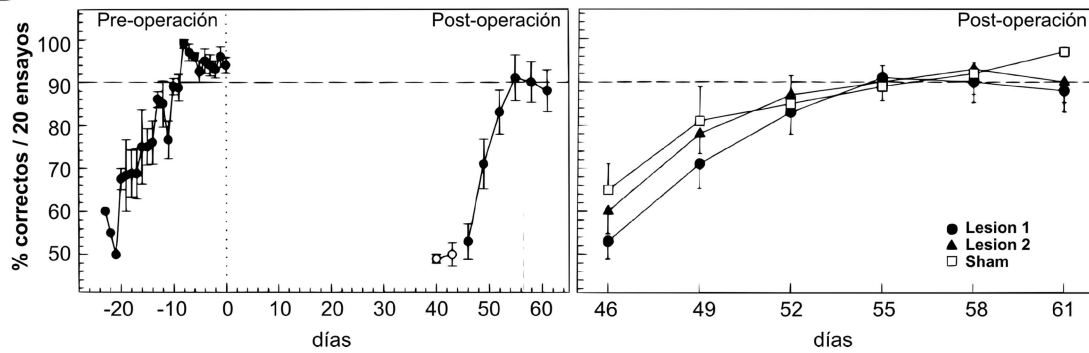


Figura 8. Regeneración del epitelio olfatorio. A, Imágenes del epitelio olfatorio en donde se observan las ONS marcadas con OMP (proteína marcadora olfatoria) en condiciones control y 5 y 35 días después de la administración de MTZ. Se puede ver que después de 35 días el OE ha sido regenerado (modificado de Suzukawa et al., 2011). B, Imagen del circuito P2 marcado con LacZ. C, Imagen del circuito P2 en B, 40 días después de la sección quirúrgica de los axones. Se puede observar que la proyección de los axones P2 en el OB se encuentra alterada después de la reinervación (modificado de Costanzo, 2000). D, Grafica que muestra el desempeño de roedores en una prueba de discriminación. Se puede observar que 40 días después de la sección de axones los roedores pierden la capacidad de hacer la prueba. Sin embargo roedores entrenados después de la lesión quirúrgica tienen la misma curva de aprendizaje que los no lesionados (Sham) (modificado de Yee and Costanzo, 1998).

#### **1.4.1 Metimazol como agente toxico del OE**

Entre las toxinas de administración sistémica utilizadas para degenerar el OE se encuentra la toxina anti-tiroidea metimazol (MTZ). En el sistema olfatorio, su blanco principal son las células sustentaculares y glándulas de Bowman (Bergman and Brittebo, 1999). Ambas células poseen gran actividad de citocromo P450 que metaboliza el MTZ rápidamente, al mismo tiempo que produce radicales libres que degeneran estas células e indirectamente a las OSN (Bergstrom et al., 2003). La degeneración de las células de sustento lleva la pérdida del soporte del OE dejando intactas las células horizontales en su base. Esta población de células da origen después a todos los elementos que conforman el OE (Leung et al., 2007). Este proceso de degeneración por MTZ no provoca daño a la LP ni induce la formación de cicatriz glial (Bergman et al., 2002). Estas características lo hacen ideal para estudiar el proceso de regeneración de circuitos específicos en el sistema olfatorio.

## **5 Planteamiento del Problema**

Hasta el momento se plantea que el sistema olfatorio es incapaz de regenerar circuitos específicos después de una lesión, lo que lleva a la pérdida de habilidades olfatorias aprendidas previamente. Debido a que los mecanismos que permiten la integración de nuevas neuronas sensoriales en circuitos específicos parecen ser los mismos que los que determinan la formación de glomérulos durante el desarrollo, nuestro estudio se enfoca en observar la capacidad regenerativa del sistema olfatorio después de la administración de MTZ, una toxina sistémica que no daña la LP ni produce cicatriz glial. En estas condiciones seguimos la regeneración de los circuitos glomerulares M72 e 17 para determinar si después de la reinervación del BO es posible observar su recuperación topográfica y funcional, utilizando para este último fin los ligandos preferentes de estos receptores.

## **6. Hipótesis**

1.- Las neuronas sensoriales olfatorias son capaces de regenerar circuitos glomerulares específicos después de una lesión extensiva del epitelio olfatorio.

2.- La recuperación de la organización glomerular será suficiente para rescatar habilidades olfatorias aprendidas previamente.

## **7. Objetivo general**

Estudiar anatómica y funcionalmente la capacidad regenerativa de los circuitos glomerulares después de la administración de MTZ.

### **Objetivos particulares**

1. Determinar el curso temporal de la regeneración y evaluar la recuperación anatómica de los circuitos glomerulares después de la administración de MTZ.
2. Estudiar si el proceso de regeneración se asemeja a la formación de circuitos glomerulares durante el desarrollo.
3. Evaluar la recuperación funcional de los circuitos glomerulares después de la regeneración.

## **8 Resultados**

## 8.1 Parte 1

### 8.1.1 Recuperación anatómica

Para poder seguir la regeneración de circuitos específicos utilizamos ratones homocigotos de las líneas M72-IRES-tauTLZ (M72TLZ) e I7-IRES-tauGFP (I7TGFP), en estos ratones modificados genéticamente la expresión de un marcador histológico (LacZ o GFP) se encuentra directamente regulada por el promotor endógeno del OR lo que permite marcar de manera selectiva a las OSN que expresan el receptor en cuestión (Figura 9). Adicionalmente el marcador se encuentra acoplado a la proteína de microtúbulos tau lo que permite observar sus proyecciones axónicas en el bulbo olfatorio (Mombaerts et al., 1996).

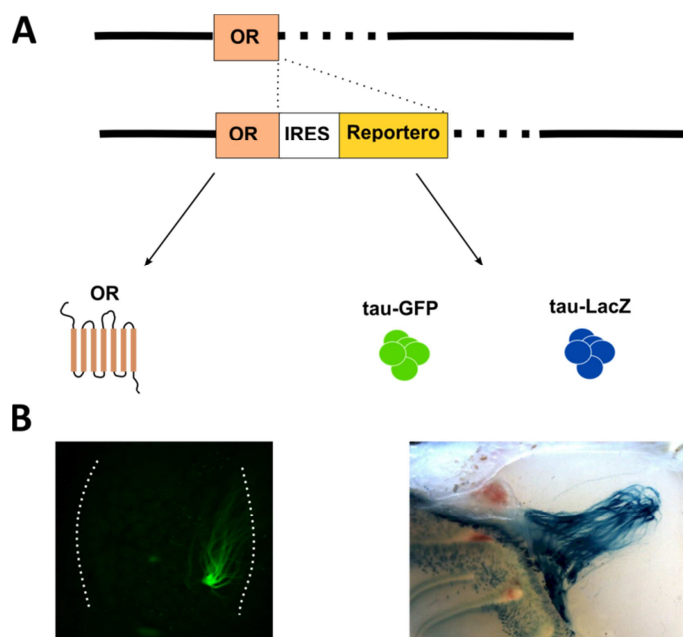


Figura 9. Modificación genética para visualizar OSN. A, La secuencia endógena del OR es modificada al añadir el reportero junto con la secuencia IRES (sitio interno de entrada a ribosoma). Esto permite la codificación del reportero y del OR de manera separada. B, imágenes representativas de los circuitos marcados con GFP (vista dorsal) o LacZ (vista medial).

### 8.1.2 Regeneración del circuito M72

Al exponer el tejido fijado de ratones M72TLZ en presencia de X-gal (el sustrato de la enzima LacZ) es posible observar el precipitado azul producto de esta reacción. En la figura 10A se observa que las neuronas LacZ positivas se encuentran en la región dorsal de las turbinas, sus axones proyectan a la región dorsal del bulbo olfatorio donde coalescen formando dos glomérulos, uno ubicado en la región medial y otro en la región lateral (el lateral no se muestra en la figura 10A). Es importante mencionar que la correspondencia entre la región (dorsal) donde se ubican las neuronas en el OE y el glomérulo correspondiente en el OB (dorsal también) es una característica que se observa en muchos de los circuitos glomerulares. Para degenerar el OE administramos una única dosis de MTZ (0.1mg/gr, i.p.) a ratones de 4-5 semanas, debido a que a esta edad se ha concluido la maduración postnatal para este circuito. Después de cinco días de la administración de MTZ virtualmente todas las neuronas M72 han degenerado (Figura 10B), incluso 10 días después sigue siendo muy evidente la ausencia de cuerpos celulares. Sin embargo los axones positivos a LacZ son apreciables en el OB (Figura 10C); de manera interesante en ninguno de los casos observados las fibras desaparecieron en su totalidad. A partir del día 15 es posible observar que nuevos cuerpos celulares aparecen en el OE y su número aumenta de manera progresiva conforme transcurren los días post-lesión (Figura 10F). De manera importante, la ubicación en el epitelio olfatorio de las neuronas M72 es idéntica después de la regeneración, similar a lo que se ha descrito con otras poblaciones de OSN después de una lesión (Iwema et al., 2004). La característica más relevante que se puede observar después de 45 días es que la proyección de los axones hacia el bulbo olfatorio se restablece, incluso es posible ver a simple vista el parecido cualitativo entre animales control y regenerados. Sin embargo, se aprecian axones dispersos en el OB (Figura 10E).

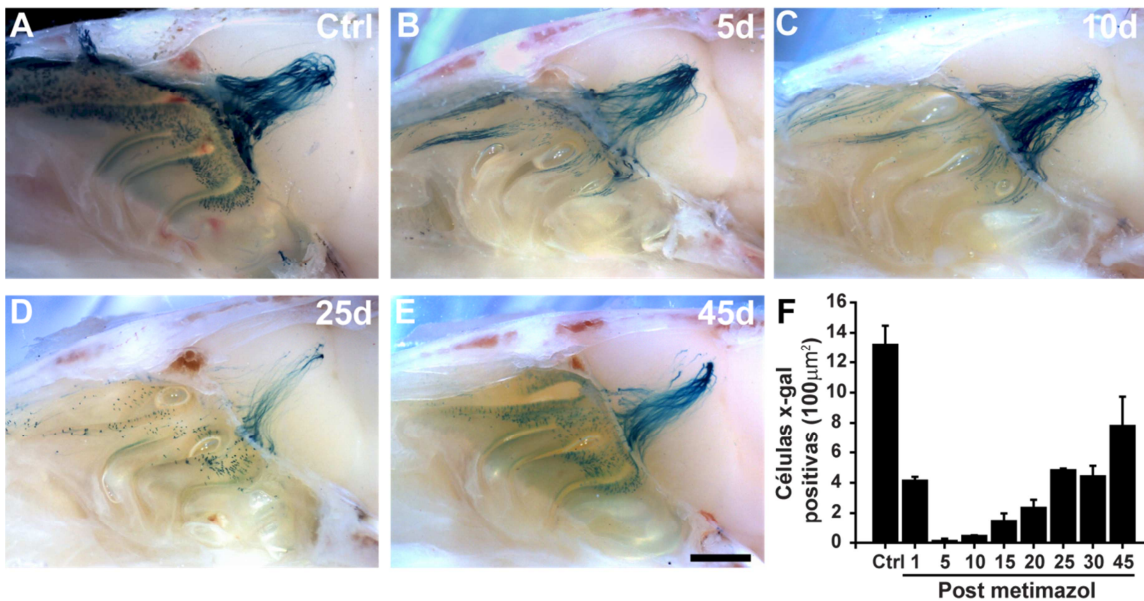


Figura 10. El patrón de inervación de circuito M72 es recuperado después de la administración de MTZ. A, Vista lateral del OE y OB donde se puede observar el patrón de inervación de los axones M72 en el OB. B y C, Cinco y diez días después de la administración de MTZ se eliminan casi en su totalidad las ONS en el OE aunque los axones permanecen en el OB. D, Después de 25 días se observan nuevos cuerpos celulares y axones inervando el OB. E, 45 días después el circuito M72 parece cualitativamente similar a la condición control. F, Histograma que muestra la recuperación de neuronas en el OE después de la administración de MTZ. Escala 500μm.

### 8.1.3 Regeneración de neuronas M72 en el epitelio olfatorio

Ya que observamos axones que persistieron después del tratamiento con MTZ investigamos que tan extensiva era la degeneración producida, y así determinar si había células M72 que escaparan a la degeneración. Para este fin realizamos cortes coronales del epitelio olfatorio de ratones control y regenerados de 10 y 45 días después de la administración de MTZ. En la figura 11 se observa las imágenes representativas de los cornetes. Los conteos de neuronas M72 indican que después de 10 días se elimina casi el total de cuerpos neuronales ( $7.6 \pm 0.5$ ,  $0.1 \pm$



0.048 células por mm de longitud, media  $\pm$  SEM, control and 10 días post lesión respectivamente,  $p < 0.0001$ ) aunque, como se observo anteriormente, axones positivos a LacZ se pueden observar aun en la LP. La eliminación de las OSN se ve acompañada de una reducción significativa en el grosor del EO ( $96.67 \pm 4.8$ ,  $42.04 \pm 1.2 \mu\text{m}$ , media  $\pm$  SEM, control and 10 días post-lesión respectivamente,  $p < 0.0001$ , figura 11E), que indica que todas las poblaciones de OSN son degeneradas por igual. De manera interesante el total de la población es recuperada después de 45 días, al igual que el grosor del OE (Figura 11C y E).

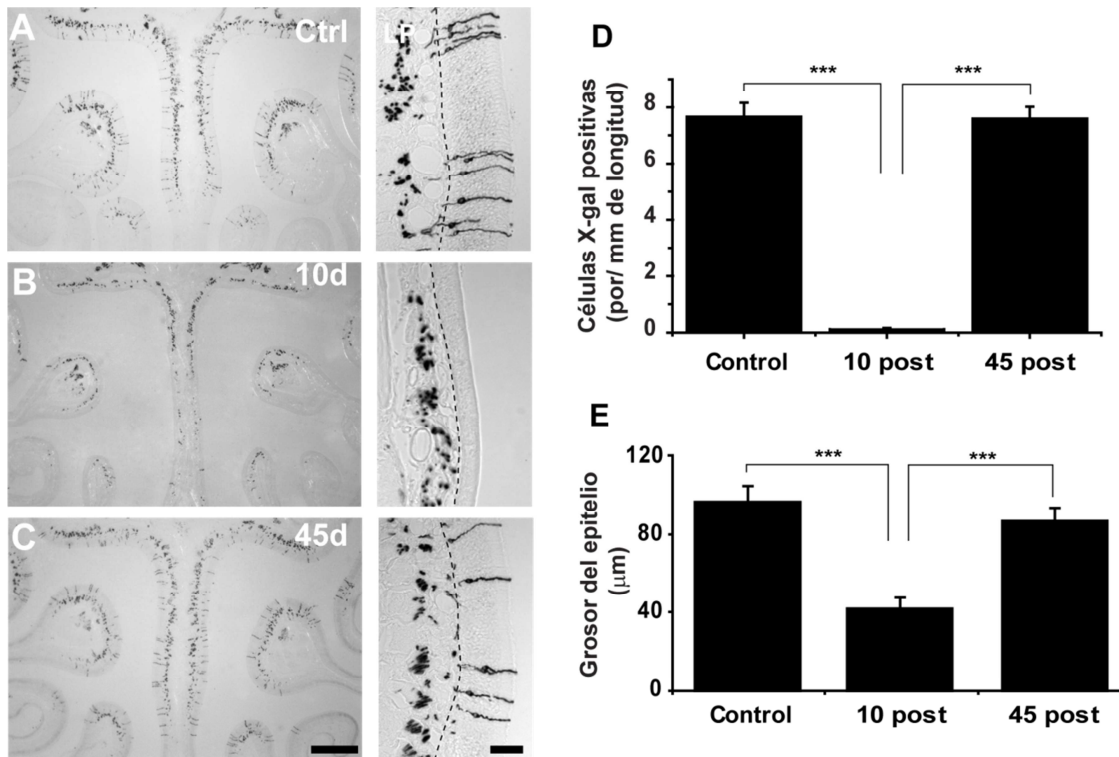


Figura 11. La población de neuronas M72 es recuperada después de la administración de MTZ. A, Corte coronal de las turbinas donde se aprecia el OE y las neuronas M72 (derecha). B, Después de 10 días no se aprecian cuerpos neuronales aunque los axones permanecen en la LP. C, Después de 45 días el OE es indistinguible del control. D, Histograma del conteo de neuronas M72 en el OE donde se observa la reducción significativa de las neuronas M72 (Prueba de Tukey,  $n=4$ ,  $p<0.0001$ ). E, el grosor del OE se ve disminuido significativamente después de la administración de MTZ (Prueba de Tukey  $n=4$ ,  $p<0.0001$ ). Escalas 200 y  $50\mu\text{m}$  para acercamientos.

#### **8.1.4 Localización del circuito M72 regenerado**

A continuación analizamos la proyección de los glomérulos regenerados en el BO después de 45 días. Para poder determinar de manera más precisa la posición de los glomérulos normalizamos la variación de tamaño del OB, delimitando sus bordes en su aspecto dorsal establecimos un plano donde ubicar las coordenadas de posición de cada glomérulo observado en ambas condiciones. En la figura 12C se presenta el plano normalizado con la posición de los glomérulos en condición control (puntos azules) y regenerados de 45 días (puntos naranjas), incluyendo la media (puntos rellenos) y la distancia estándar ( $2x$ , circunferencia alrededor de la media). Al utilizar el doble de la distancia estándar nos permite visualizar la región donde se localizan los glomérulos con un 95% de probabilidad. Para caracterizar de mejor forma la posición de los glomérulos utilizamos dos parámetros: la precisión y la exactitud; la primera nos habla de la variación intrínseca de la proyección de los axones en el OB y la segunda de la posición relativa propiamente. Para determinar la primera buscamos diferencias entre las distancias de los glomérulos a su media correspondiente (distancia euclidiana), como se muestra en la grafica de la figura 12D no existen diferencias en la variación con que los glomérulos regenerados se localizan en el OB ( $p>0.05$ ). Por otro lado analizamos las coordenadas de la posición relativa de los glomérulos sin encontrar diferencias significativas (Figura 12 E,  $p>0.05$ ). En su conjunto

estos resultados muestran que tanto la variación de la posición como la posición perse se mantienen después del proceso de regeneración sugiriendo fuertemente que los procesos de guía axonal que determinan la formación del mapa glomerular están presentes en el animal adulto.

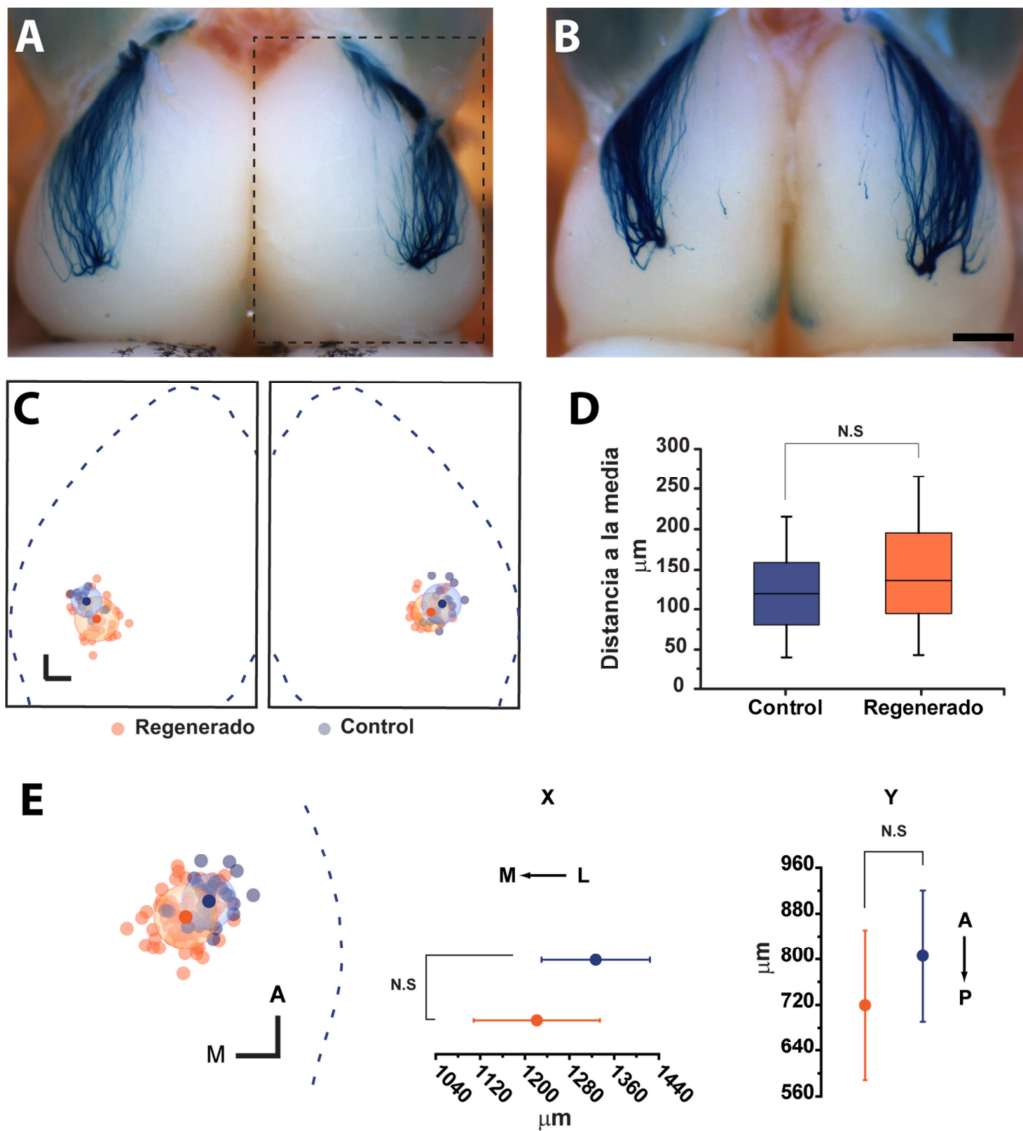


Figura 12. La posición del circuito M72 es recuperada después de la regeneración. A, Imagen de la vista dorsal del OB en condiciones control, donde se observa el glomérulo lateral M72. B, Imagen representativa del OB 45 días después de la administración de MTZ. C, Planos normalizados de la vista dorsal del OB (rectángulo en A) donde se observa la localización de glomérulos control (azul) y regenerados (naranja). D, Histograma de las distancias Euclidianas en ambas condiciones, donde se muestra que no hay diferencia significativa (Prueba de Levene). E, Resumen de todos los glomérulos proyectados en el plano derecho (izquierda). No hay diferencias significativas en la posición de los glomérulos control (n=32) y regenerados (n=42) en ninguno de los dos ejes (x, y) (Prueba de Bonferroni).

### 8.1.5 Regeneración del circuito I7

Para extender nuestro estudio y determinar si en otras regiones del bulbo olfatorio se regeneran circuitos glomerulares después de la administración de MTZ utilizamos ratones I7TGFP. Los glomérulos I7 se localizan en la región ventral del bulbo olfatorio. Para poder observar de manera adecuada estos glomérulos realizamos cortes coronales del bulbo olfatorio en la zona donde se ubica el glomérulo lateral de I7 (~550  $\mu\text{m}$  desde la región más anterior). En la figura 13 se muestra el glomérulo lateral en la región antero-ventral del bulbo olfatorio, como es común en los circuitos glomerulares los axones GFP positivos inervan esta región coalesciendo en un glomérulo (Figura 13A, flecha). Después de 45 días de la administración de MTZ podemos observar que los axones inervan la misma zona del bulbo olfatorio coalesciendo esta vez en dos glomérulos cercanos. Es posible observar también que algunos glomérulos son inervados de manera irregular ya que las fibras no ocupan de manera total el espacio glomerular (Figura 13B, flecha derecha). A pesar de estas diferencias podemos concluir que después de la regeneración el circuito glomerular I7 restablece su ubicación.

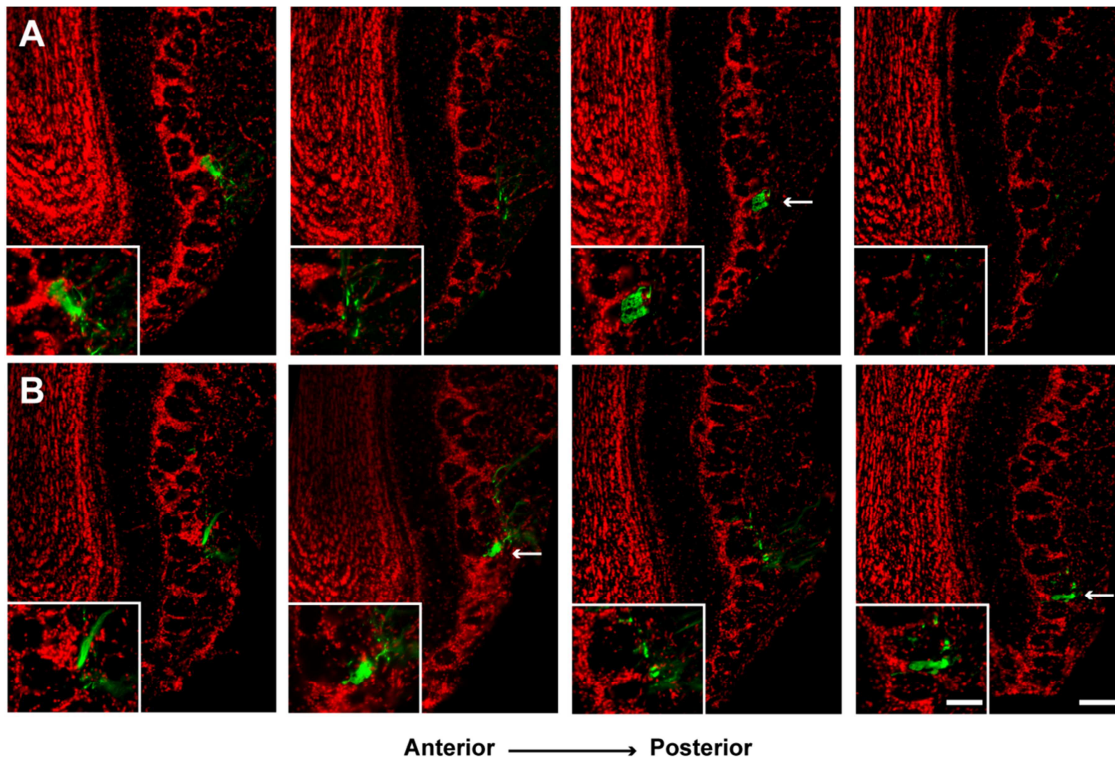


Figura 13. El circuito I7 es recuperado después de la regeneración. A, Cortes seriales de la región antero-ventral de un ratón I7-IRES-tau-GFP, donde se muestra la innervación de las fibras sensoriales coalesciendo en una glomérulo (flecha, derecha), acercamientos de las fibras GFP se muestran en los recuadros. B, Imágenes de la misma zona mostrada en A 45 días después de la administración de MTZ, se puede observar que las fibras penetran en la capa glomerular en dos ocasiones (flechas y recuadros, centro y derecha). En un caso parece que la innervación en el glomérulo es irregular (derecha). Escalas 100 y 50 $\mu$ m para los recuadros.

### 8.1.6 Formación de circuitos glomerulares después de la administración de metimazol

Para ahondar en las características que presenta la regeneración de circuitos olfatorios en etapas adultas nos enfocamos en el papel que tiene la actividad sensorial tanto en la formación como en el refinamiento de estos circuitos. Primero ocluimos una narina de ratones M72TLZ diez días después de la administración de MTZ para observar la regeneración de los glomérulos laterales 35 días después. Como se puede observar en la figura 14A la formación de los

glomérulos no se ve afectada en ausencia de entrada sensorial sin embargo, y como se ha reportado en algunos casos (Cavallin et al., 2010), el número de neuronas sensoriales se ve disminuido del lado ocluido (flecha). Por otro lado seguimos el proceso de regeneración hasta 90 días después de la administración de MTZ para determinar si existía refinamiento de los glomérulos formados o de las fibras dispersas en el bulbo como se ha reportado durante el desarrollo postnatal (Zou et al., 2004). Como se observa en la figura 14B después de la regeneración hay un aumento significativo de glomérulos por hemibulbo ( $1.24 \pm 0.4$ ,  $1.8 \pm 0.7$ , glomérulos por hemibulbo, media  $\pm$  SEM, control and regenerado respectivamente,  $p < 0.05$ ) que se mantiene incluso después de 90 días. De manera similar el número de axones dispersos en el OB permanece igual al comparar 45 y 90 días después de la administración de MTZ. Incluso el patrón en el que se ubican estas fibras permanece cualitativamente similar en ambas condiciones (Figura 14D y E). De esta manera podemos inferir que a pesar de que el proceso de formación de los glomérulos en el adulto es muy similar al que se observa durante el desarrollo normal carece totalmente del proceso de refinamiento.

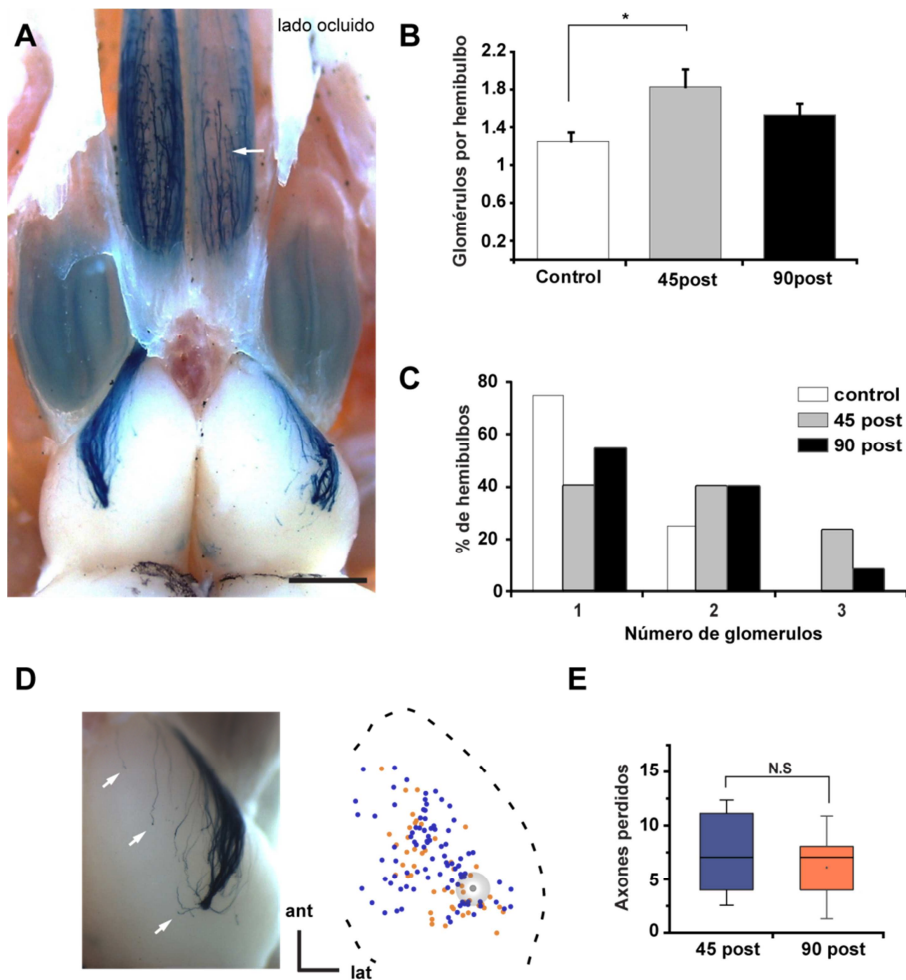


Figura 14. La actividad sensorial no produce refinamiento en los circuitos regenerados. A, Imagen dorsal del OE y OB en un ratón 45 días después de la administración de MTZ, el lado derecho se ocluyó desde el día 10 de la regeneración. Se puede observar que no hay efecto aparente en la regeneración del glomérulo M72, en cambio si se observa una disminución de las OSN en el epitelio olfatorio (flecha), similar a lo reportado en experimentos de oclusión. B, Histograma del número de glomérulos encontrados en condiciones control, 45 y 90 días después la lesión, donde se muestra un aumento significativo después de la regeneración (Kruskal Wallis y pos hoc Dunn). C, Distribución del número de glomérulos en cada condición. D, Imagen del OB dorsal donde se señalan los axones perdidos (flechas). Diagrama de la ubicación de los axones perdidos de ratones de 45 y 90 días después de la lesión (puntos azules y naranjas respectivamente), en el mismo se ubica la posición del glomérulo (gris). Histograma del número de axones perdidos en ambas condiciones, donde se muestra que no hay diferencia significativa (Prueba t de Student). Anterior (ant), lateral (lat). Escala 1mm.

## **8.2 Parte 2**

### **8.2.1 Recuperación funcional después de la regeneración**

En la primera parte de este estudio mostramos que después de la administración de MTZ existe la recuperación de circuitos específicos en el OB, a continuación investigamos si esta recuperación anatómica se corresponde con una funcional, enfocándonos en respuestas conductuales aprendidas e innatas.

### **8.2.2 Discriminación de odorantes preferentes de M72 e I7**

Como se mencionó previamente los estudios realizados hasta el momento muestran que tras la reinervación del OB se pierden habilidades olfatorias aprendidas previo a la lesión, por ello quisimos investigar si una tarea que involucrara a los circuitos I7 y M72 se restablecía al igual que estos circuitos después de la administración de MTZ. Para ello se entrenaron ratones M72TLZ en un laberinto de tres brazos para asociar un determinado odorante con agua como recompensa. Se utilizaron dos pares de odorantes para esta prueba, a cada par correspondió un grupo de ratones distinto. El grupo 1 de ratones fue entrenado con 2-heptanona y heptaldehido, mientras que el grupo 2 con citral y acetofenona. En ambos grupos los ligandos preferentes de M72 e I7 fueron asociados a la recompensa (heptaldehido y acetofenona respectivamente), únicamente un brazo fue seleccionado para colocar el odorante asociado. Después de tres semanas de entrenamiento ambos grupos fueron sometidos a la primera prueba (Test-Pre). De manera breve esta consistió en colocar a cada ratón en el laberinto durante 5 min sin colocar recompensa. El desempeño se determinó al cuantificar las entradas en las que el ratón buscó agua entre las entradas totales, esto en cada brazo. Al final la



comparación se estableció entre el brazo con el odorante asociado y el promedio de los no asociados. En la figura 15B y C se puede observar que después de 3 semanas ambos grupos son capaces de discriminar entre los odorantes utilizados (Test-Pre). Posteriormente cada grupo de discriminación fue separado en grupo control (CTRL, n=6) y experimental (EXP, n=6) antes de la administración de MTZ (designada como día 0). Después, dos pruebas más se realizaron a los días 10 (Test 10-Post) y 45 días (Test 45-Post). En la figura 15A resumimos el diseño experimental del experimento. Como se puede observar el grupo control puede realizar la tarea incluso después de 45 días (Grupo 1:  $0.7 \pm 0.04$ ,  $0.12 \pm 0.03$ , desempeño en brazo + y - respectivamente; Grupo 2:  $0.7 \pm 0.03$ ,  $0.08 \pm 0.01$ , desempeño en brazo + and brazo - respectivamente, media  $\pm$  SEM,  $p < 0.01$ ). Después 10 días (Test 10-Post), solamente el grupo experimental perdió la capacidad de discriminar en ambos grupos (Grupo 1:  $0.45 \pm 0.1$ ,  $0.43 \pm 0.2$ , desempeño en brazo + y - respectivamente; Grupo 2:  $0.57 \pm 0.09$ ,  $0.37 \pm 0.09$ , Desempeño en brazo + y - respectivamente; media  $\pm$  SEM,  $p > 0.05$ ), situación que se correlaciona con nuestros resultados que muestran la falta de neuronas sensoriales a esta fecha. De manera importante se observa que tras 45 días ambos grupos son capaces de discriminar nuevamente (Grupo 1:  $0.7 \pm 0.06$ ,  $0.2 \pm 0.04$ , desempeño en brazo + y - respectivamente; Grupo 2:  $0.6 \pm 0.08$ ,  $0.2 \pm 0.04$ , Desempeño en brazo + y - respectivamente, media  $\pm$  SEM,  $p < 0.05$ ).

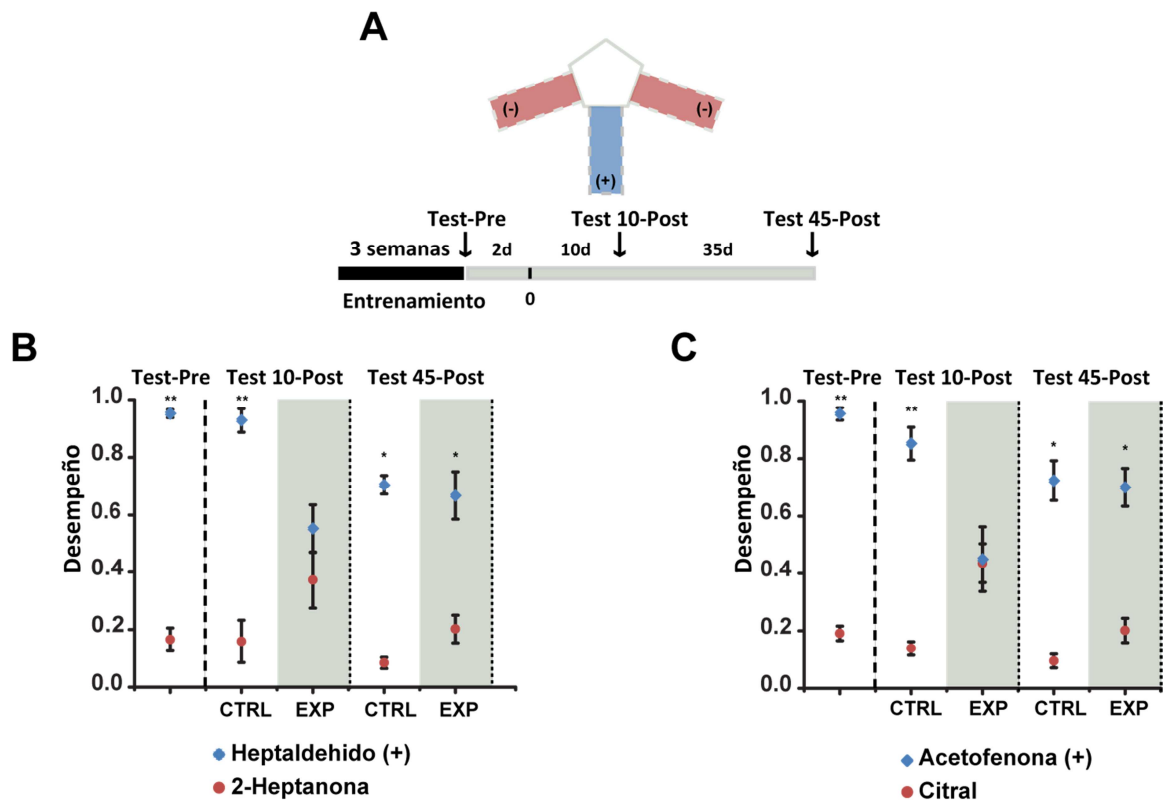


Figura 15. La memoria de una tarea de discriminación es recuperada después de la regeneración. A, Diagrama de la configuración del laberinto utilizado y curso temporal del experimento, el día de la administración de MTZ se indica con 0. B y C, Desempeño del Grupo 1 y 2 donde se observa la recuperación después de 45 días (Test 45-Post). \* denota  $p < 0.05$ , \*\* denota  $p < 0.01$ .

### 8.2.3 Respuesta innata a odorantes después de la regeneración

Se sabe actualmente que odorantes relevantes para la conducta de los mamíferos son codificados al mismo tiempo en los diferentes subsistemas que componen el sistema olfatorio: el sistema vomeronasal, el sistema trigémino y sistema olfatorio principal (Munger et al., 2008). Sin embargo para pocos de estos estímulos se ha determinado que existe una contribución determinante del sistema olfatorio principal i.e. el OE y OB. El compuesto extraído de las heces de zorro trimetil tiazolina (TMT) y la orina son compuestos que inducen una clara respuesta

innata, el primero de aversión y el último de atracción (sobretudo en sexos opuestos), se ha demostrado que el OB es el encargado de codificar ambas respuestas (Mandiyan et al., 2005; Kobayakawa et al., 2007). Por ello decidimos ahondar en la recuperación funcional después de la administración de MTZ utilizando una prueba de preferencia para determinar si después de la regeneración estas respuestas innatas permanecían. La prueba consiste en medir el tiempo que los ratones pasan investigando un papel filtro con el compuesto en cuestión, estableciendo como criterio de neutralidad agua destilada. En la figura 16A se puede apreciar que en ratones controles el TMT produce fuerte aversión mientras que la orina atracción considerable. Después de 45 días de la administración de MTZ no existen diferencias significativas de la respuesta a orina ( $33.4 \pm 2.8$ ,  $19.1 \pm 5.1$  s, control (n=6) y regenerado (n=6) respectivamente, media  $\pm$  SEM,  $p > 0.05$ ). Sin embargo la respuesta a TMT si presenta cambios significativos, si bien sigue siendo aversiva, se ve atenuada ( $0.8 \pm 0.1$ ,  $2.4 \pm 0.7$  s, control (n=6) y regenerado (n=6) respectivamente, media  $\pm$  SEM,  $p < 0.05$ ). Adicionalmente y para complementar este resultado observamos que la respuesta de huida (cambios abruptos de la cabeza al acercarse a TMT) cambia drásticamente después de la regeneración ( $0.89 \pm 0.06$ ,  $0.1 \pm 0.04$  s, control (n=6) and regenerado (n=6) respectivamente, media  $\pm$  SEM,  $p < 0.01$ , figura 16B).

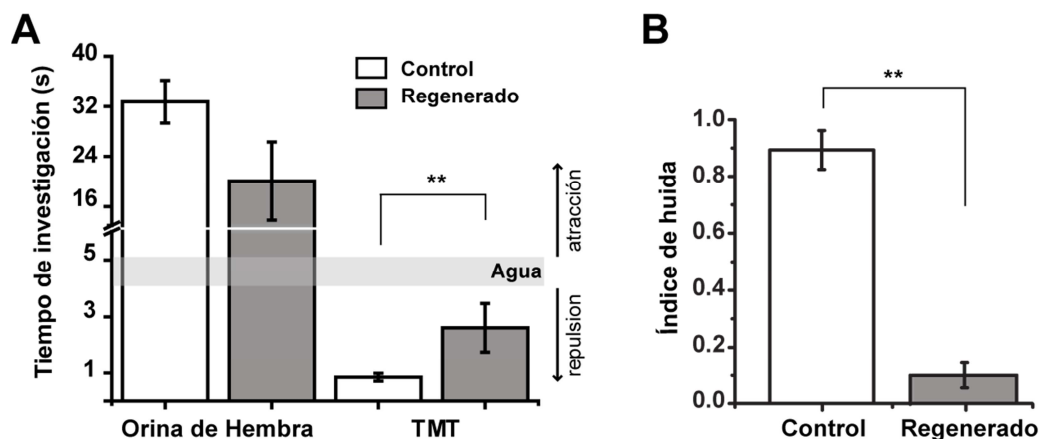


Figura 16. La respuesta innata los olores es recuperada parcialmente después de la regeneración. A, Histograma de los tiempos de investigación para orina TMT en los animales control y 45 después de la lesión. Después de la regeneración no hay diferencias en el tiempo que los ratones investigan el orina de hembra. Por otro lado la respuesta a TMT aunque sigue siendo de repulsión es diferente del control (Prueba de Mann Whitney), la respuesta neutra a agua se muestra en la banda gris. B, Histograma del índice de huida, donde se muestra una diferencia significativa después de la regeneración.

## **9 Discusión**

Uno de los principales problemas en las neurociencias es poder restaurar o suplir conjuntos de neuronas en animales adultos con el fin de tratar enfermedades neurodegenerativas. En esta línea de estudio mucho esfuerzo se enfoca en promover la regeneración de circuitos, en cambio y de manera complementaria diversas líneas de investigación estudian los mecanismos que permiten a las neuronas nuevas integrarse a circuitos neuronales ya existentes, sin embargo hasta la fecha no existe en mamíferos un modelo de estudio donde se recuperen circuitos neuronales específicos. Nuestros datos en este sentido muestran que en el sistema olfatorio es posible observar la recuperación de circuitos glomerulares específicos después de una lesión extensiva de las OSN, más aun esta recuperación anatómica es suficiente para que trazos de memoria asociados a estos circuitos puedan ser recordados después de la reinervación del OB.

### **9.1 Regeneración de circuitos glomerulares específicos**

Como ya se mencionó, los diferentes métodos para degenerar el EO utilizados a la fecha alteran el proceso de navegación de los axones de alguna manera; ya sea a nivel bulbar, con una cicatriz glial o a nivel del OE, dañando la LP (Costanzo, 1985; Schwob et al., 1995; Schwob et al.,

1999; John and Key, 2003; Schwob, 2005; Kobayashi and Costanzo, 2009). El empleo de MTZ como agente toxico permitió observar la regeneración sin provocar ninguna de las alteraciones anteriores. En consecuencia el presente trabajo muestra una remarcable recuperación anatómica de los glomérulos I7 y M72, circuitos ubicados en regiones distintas del OB (ventral y dorsal, respectivamente). En contraste, estudios previos en el circuito P2, ubicado en la región ventral, mostraron la falta de recuperación después de la reinervación (Costanzo, 2000; John and Key, 2003). Ya que el circuito I7 se ubica ventralmente al igual que el de P2 es posible descartar una diferencia regional del fenómeno, más aun tomando en cuenta que la región dorsal de OB es inervada pobremente después de la regeneración (Schwob et al., 1999; Schwob, 2002), y el circuito M72 se localiza en ella. En este sentido es muy probable que la falta de recuperación observada en estudios previos se deba entonces a la presencia de barreras físicas y modificaciones estructurales (en las vías donde los axones se empaquetan y organizan para inervar el OB) provocadas por los métodos de degeneración mismos.

De manera interesante observamos que después de la degeneración axones X-gal positivos permanecen visibles el OB y la LP, aun cuando no existían cuerpos neuronales en el epitelio olfatorio, de hecho en ningún caso se observo que desaparecieran durante el curso temporal. Debido a nuestros conteos es más factible pensar que estos son axones en proceso de degeneración que aun contienen la proteína X-gal y que coexisten con los axones en proceso de navegación de las nuevas neuronas. Si de alguna manera estos contribuyen para el proceso de reinervación es una cuestión importante que no fue posible examinar más a fondo.

Después de la regeneración el circuito M72 se ubicó en una región idéntica a la de ratones control de la misma edad, y más aun se demostró que la variación con la que los axones

coalescen en una zona determinada se mantuvo igual, incluso a pesar del aumento de estructuras glomerulares. Esto nos sugiere que los mecanismos que dan forma al mapa glomerular durante el desarrollo se mantienen en el adulto, desde el proceso de empaquetamiento durante su viaje a través de la LP y placa cribiforme hasta la segregación última ya en el glomérulos particulares en el OB. Estos procesos dependen principalmente de las mismas fibras sensoriales, que producen un distinto patrón de moléculas de adhesión de manera gradual a lo largo del OB (Imai et al., 2006; Serizawa et al., 2006; Imai et al., 2009; Sakano, 2010; Takeuchi et al., 2010) (véase arriba), por lo que este resultado corrobora que así como en el desarrollo, durante la etapa adulta los mecanismos principales de formación del mapa glomerular residen en las fibras sensoriales. Sin embargo, después de 90 días de la degeneración no se observó que se refinaran los circuitos glomerulares, ya que los glomérulos extras y los axones “perdidos” permanecieron en número y en ubicación. En este respecto algunos estudios han abordado el papel que tiene la actividad sensorial en los procesos de formación de glomérulos en el OB. Hasta la fecha se tiene consenso que durante la formación de glomérulos la actividad sensorial no participa, en cambio durante el proceso de maduración instruye el refinamiento de los circuitos (Zou et al., 2004). En el primer caso pudimos corroborar que al bloquear la entrada sensorial en una narina, esto no influía en la formación del glomérulo, sin embargo no observamos el proceso de refinamiento después de 90 días. Lo que sugiere que este proceso está ausente en el adulto y que tiene que ver con factores que ya no se encuentran presentes en el OB. En este momento, el proceso de refinamiento permanece poco estudiado y no existen mecanismos propuestos que expliquen el proceso. Sin embargo, diversos estudios han encontrado que la estimulación sensorial postnatal influye de diversas

formas en los circuitos glomerulares, acelerando el refinamiento de los glomérulos o incluso aumentando su número (Kerr and Belluscio, 2006; Valle-Leija et al., 2012). En todo caso este es un tema de discusión actual en la investigación del proceso de formación del mapa glomerular.

## **9.2 Recuperación funcional**

La presencia de un odorante particular en el medio produce la activación de varios OR en el OE y por ende de glomérulos en el bulbo olfatorio, lo que constituye un mapa de activación que se encuentra estrechamente relacionado con el olor en cuestión. El modelo más aceptado plantea que este mapa de activación no solamente es el reflejo de estimulación de los OR si no que juega un papel preponderante en proceso de identificación y finalmente de la percepción de los olores. En este sentido cuando el mapa glomerular se ve modificado después de la regeneración solo las tareas aprendidas son las que se afectan y no el proceso perse de identificación o discriminación, lo que apoya esta hipótesis (Costanzo, 1985; Yee and Costanzo, 1995, 1998; Costanzo, 2000; Christensen et al., 2001; Schwob, 2005). Sin embargo, no quedaba claro si esta deficiencia se debía a la pérdida de la memoria asociada al odorante o a la activación de un mapa glomerular diferente, que se reconociera como distinto. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que tras la administración de MTZ las tareas conductuales aprendidas previamente son recuperadas después de la regeneración. Para esta tarea conductual utilizamos los odorantes preferentes de los receptores M72 e I7, acetofenona y heptaldehido respectivamente, para aseguramos que los circuitos en los que seguimos la recuperación anatómica participaran en el proceso de identificación. Sin embargo, cada uno de ellos activa un número considerable de OR y no se tiene claro si hay una contribución particular

de los glomérulos que responden preferentemente en el procesamiento de identificación o percepción. Se asume actualmente que varios glomérulos en su conjunto contribuyen a la identidad de un odorante (Wilson and Mainen, 2006). Esto sugiere que después de la administración de MTZ son más los circuitos que se regeneran aparte de los observados, incluyendo a los activados por 2-heptanona, citral, TMT y orina (véase abajo). En su conjunto nuestros datos muestran que la organización de la entrada sensorial es determinante en el proceso de identificación de los olores.

Como mostramos, los circuitos glomerulares sufren cambios después de la regeneración ya que aumenta su número y la inervación de algunos de ellos es irregular. Si asumimos un grado similar de modificación en otros circuitos glomerulares, los mapas de activación también se podrían ver modificados. De qué forma afecta esta diferencia al proceso de percepción es desconocido, sin embargo, se sabe que los mapas de activación sí son dinámicos durante el tiempo que dura el estímulo (Stopfer et al., 2003; Carey et al., 2009). El simple incremento en la concentración de un olor induce un cambio en el mapa de activación, al estimular más OR hay mayor activación glomerular (Johnson and Leon, 2000). En otro caso la presencia de un olor de “fondo” durante la realización de una tarea provoca la sensibilización de los OR y de esta manera modifica en cierto grado los mapas de activación sin modificar la percepción (Verhagen et al., 2007). En este escenario mapas diferentes pueden evocar una percepción similar, sin embargo no podemos descartar que los animales regenerados tengan otro tipo de deficiencias al realizar tareas conductuales más elaboradas. En todo caso delimitar la relación entre mapas e identidad de odorantes es un problema abierto a estudio.



Se tiene conocimiento de que odorantes particulares inducen respuestas estereotipadas en mamíferos. Actualmente se sabe que estos odorantes son reconocidos de manera simultánea por el órgano vomeronasal, las terminales trigeminales y el OE (Stowers and Logan, 2010), sin embargo para pocos de ellos se sabe que el sistema olfatorio principal (OE-OB) es determinante y suficiente para producir la respuesta innata. El TMT y la orina son odorantes que provocan una respuesta innata muy estereotipada, el primero de aversión y la última de atracción. En el caso de TMT se ha demostrado recientemente que la respuesta aversiva es mediada por un grupo de glomérulos localizados en la región dorso-medial que envían información al núcleo cama de la estria terminal (BNST), la simple presencia de ellos permite que se desencadene la conducta (Kobayakawa et al., 2007). Incluso se ha demostrado que ratones deficientes para TRPC2 (componente crucial de la vía de señalización en el neuronas vomeronasales) presentan aversión a TMT igual que animales controles (Papes et al., 2010). En el caso de la orina se sabe que ratones deficientes en CNGA2 (componente crucial de la vía de señalización de las OSN) carecen de respuesta de atracción (Mandiyan et al., 2005), incluso la sola alteración de la organización glomerular en el BO afecta a respuesta a orina y el apareamiento (Fleischmann et al., 2008). Nuestros datos muestran que después de la regeneración ambas respuestas son restablecidas, lo que permite inferir que los circuitos que responden a cada una de ellas son restablecidos en cierto grado. Sin embargo, observamos que la respuesta a TMT si bien sigue siendo aversiva, es diferente cuantitativa y cualitativamente. Esta diferencia puede radicar en que precisamente los circuitos innatos son menos susceptibles de plasticidad y en este sentido es posible que la denervación *per se* modifique la innervación del BNST por parte de las

neuronas de relevo o incluso de las entradas centrifugales al BO. Aún se requieren más experimentos que permitan aclarar este punto.

En su conjunto nuestros datos demuestran dos aspectos importantes del sistema olfatorio: primero, que tras una degeneración extensiva del OE las neuronas sensoriales son capaces de recuperar de manera general la organización de circuitos glomerulares en el OB; segundo, que esta organización es determinante para el proceso que define la identidad de los olores. Esto coloca al sistema olfatorio como un modelo referente en el estudio de la regeneración de circuitos neuronales.

## **10 Materiales y métodos**

### **10.1 Animales**

Ratones homocigotos de las líneas M72-tau-LacZ e I7-IRES-tau-GFP de entre 6 y 9 semanas de edad bajo un background genético de c56 x CBL5 fueron utilizados para los experimentos. Todos fueron mantenidos bajo un ciclo de luz oscuridad de 12 de luz por 12 de oscuridad. Todos los procedimientos siguieron los lineamientos para uso y cuidado de animales experimentales del National Institutes of Health (NIH). Las líneas empleadas fueron desarrolladas por el Dr. Peter Mombaerts, a quién agradecemos su donación.

### **10.2 Degeneración del EO y tinción con X-gal**

Para inducir la degeneración de las neuronas sensoriales se utilizó una administración única de MTZ intraperitoneal (Sigma, 0.1mg/g) junto con una solución vehículo (PBS 0.1M, 10% DMSO). Los animales control únicamente recibieron vehículo. Para preparar el tejido cada ratón fue anestesiado con pentobarbital y perfundido intracardialmente con solución salina seguida de paraformaldehído (4% PFA en PBS). Después el cráneo completo fue pos-fijado in PFA frío por una hora y disectado para mostrar la región medial o dorsal del bulbo olfatorios. En otros casos el cráneo completo se introdujo por tres o cuatro semanas en un buffer de descalcificación con PBS-DEPC, 30% de sacarosa y 120mM de EDTA para obtener cortes coronales seriales (20 $\mu$ m) del epitelio olfatorio en un criostato Leica CM1900. Para revelar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa el tejido se incubó por 5 horas a 37°C en un buffer con 100mM de buffer de fosfatos (pH 7.4), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.01% de sodio deoxicolato, 0.02% de Nonidet P40, 5mM de ferricianuro de

potasio, 5mM de ferrocianuro de potasio y 1mg/ml de X-gal. Después el tejido se lavó durante 10 min en PBS (pH 7.4). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio estereoscópico Leica Ez4D y digitalizadas con el programa Leica FireCam. El contraste y brillo se ajustó con el programa ImageJ (NIH) sin ninguna manipulación adicional.

### **10.3 Inmunohistoquímica**

Ratones de la línea I7-IRES-tau-GFP (n=7, 3 control y 4 experimental) fueron perfundidos y sus cerebros crioprottegidos en PBS 30% sacarosa por 3 días a 4°C. Posteriormente se realizaron cortes coronales seriales (20µm); solo 1 de cada 3 fueron colectados comenzando a partir de las ~550µm. Los cortes fueron encubados en solución de bloqueo con 10% de suero normal de burro y 0.3% de Tritonx-100 durante 2 horas a temperatura ambiente, después fueron encubados con el anticuerpo policlonal de cabra anti-GFP (Abcam, 1:1000) durante 24 horas a 4°C, finalmente se encubaron con el anticuerpo secundario de burro anti cabra-Cy5 (Jackson ImmunoResearch, 1:250) durante 2 horas a temperatura ambiente y contratendidas con DAPI (Invitrogen). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio vertical de fluorescencia Leica DM6000 y digitalizadas con el software Leica LAS AF, finalmente el brillo y contraste se ajustó con ImageJ.

### **10.4 Conteo de células**

Ratones de la línea M72-IRES-tau-LacZ fueron sacrificados a los días: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 después de la administración de MTZ (n= 3, 4 por grupo) para analizar el curso temporal de la regeneración. Después de revelar la actividad de β-galactosidasa en las turbinas completas las células observables en la región medial fueron contadas con la herramienta "Analyze Particles" de ImageJ para luego obtenerse la densidad de células (células/mm<sup>2</sup>). Todas las imágenes fueron filtradas para aumentar el contraste y reducir el ruido de fondo. El conteo en cortes coronales siguió el mismo procedimiento. Uno de cada cuatro cortes fue colectado hasta un total de 29. Solo el epitelio olfatorio fue seleccionado digitalmente para el conteo.

### **10.5 Análisis de la posición de glomérulos laterales**

Imágenes de la región dorsal del bulbo olfatorio fueron tomadas de ratones control (n=12) y regenerados (n=11) para determinar la posición de los glomérulos. Para obtener la ubicación de los glomérulos de manera más precisa las imágenes del bulbo fueron normalizadas. Primero se delineó un rectángulo en cada bulbo tomando como referencia los márgenes anterior, posterior, medial y lateral, después todos los tamaños fueron promediados y normalizados, finalmente la posición de cada centroide fue ubicada en el plano normalizado. Para calcular la dispersión se calculó la distancia estándar de acuerdo a la siguiente fórmula

$$\text{Distancia Estándar} = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n}}$$

Donde  $d$  es la distancia Euclidiana entre cada punto y su correspondiente media y  $n$  es el número total de puntos.

Todas las manipulaciones de las imágenes fueron realizadas con imagej.

## 10.6 Pruebas conductuales

Ratones macho de la línea M72-IRES-tau-LacZ fueron utilizados para la prueba de discriminación y de preferencia. Para la prueba de discriminación los ratones fueron divididos aleatoriamente en dos grupos: el grupo 1 se entreno para distinguir acetofenona y citral, mientras el grupo 2 heptaldehido y 2-heptanona. Durante el entrenamiento los ratones se mantuvieron restringidos de consumo de agua (1-2 ml por día). En los primeros 2 días de entrenamiento los ratones se habituaron por 10 minutos en el laberinto (sin odorante) y el agua se colocó al final de todos los brazos en una marca específica. Durante las siguientes 3 semanas un odorante de cada par se asoció con agua como recompensa. Los odorantes se colocaron en bolas de algodón colocadas en un compartimento especial al final de cada brazo (200 $\mu$ l odorante/algodón). Dos brazos del laberinto se utilizaron para colocar el odorante no asociado (-) (citral o 2-heptanona) y uno para colocar el odorante asociado (+) (heptaldehido o acetofenona). Para minimizar el efecto del aprendizaje espacial los brazos se cambiaron aleatoriamente cada día. Cada sesión de entrenamiento duró 10 minutos (1 vez al día) en los que los ratones exploraban el laberinto y recibían agua únicamente en el brazo +. En la primera semana 50 $\mu$ l de agua (por entrada) fueron colocados y subsecuentemente se incremento 50 $\mu$ l cada semana. Para poder mantener constante el consumo de agua (1-2ml diarios) el porcentaje de recompensa se ajusto de manera correspondiente. Después de tres semanas evaluamos el desempeño de los ratones sin colocar agua (Test-Pre). Para esto cada ratón se colocó en el laberinto durante 5 minutos en los que se grabó su conducta, los videos fueron analizados posteriormente por una persona sin conocimiento acerca de la ubicación de los odorantes y condición de los ratones. El desempeño de cada ratón se calculó al dividir en número de entradas en los que el ratón investigaba en el sitio de entrega de agua durante el entrenamiento entre el número de entradas totales, esto en cada uno de los brazos.

Para los experimentos con MTZ 12 ratones de cada grupo con un desempeño  $\geq 0.85$  en el brazo + y  $\leq 0.35$  en el brazo – fueron seleccionados. Posteriormente los grupos 1 y 2 fueron separados aleatoriamente en grupo control (CTRL,  $n=6$ ) y experimental (EXP,  $n=6$ ). El grupo EXP fue inyectado con MTZ dos días después de Test-Pre mientras el grupo CTRL recibió solamente solución vehículo. El día de inyección se designo como día cero. Dos evaluaciones más se realizaron para seguir el proceso de regeneración a 10 (Test 10-Post) y 45 días (Test 45-Post).

Las soluciones stock fueron disueltas en DMSO cada 10 días y las soluciones de trabajo se disolvieron en agua diariamente en las siguientes concentraciones: citral 50mM, acetofenona 50mM, heptaldehído 10mM y 2-heptanona 10mM. Todos comprados de Sigma.

Para la prueba de preferencia se utilizaron 36 ratones. Para evitar el aprendizaje los ratones solo se utilizaron una vez y solo para un odorante. Los ratones fueron habituados en una caja (27 x 17 x 13cm) durante 30 minutos, después la caja fue remplazada por una limpia y una pieza de papel filtro con orina de hembra fresca (15  $\mu$ l), trimetil-tiazolina (TMT, 5 $\mu$ l sin diluir) o agua (15 $\mu$ l). Los videos grabados se analizaron posteriormente por una persona sin conocimiento de la condición experimental. El tiempo de investigación fue definido como las aproximaciones a menos de 1cm de distancia del papel filtro durante 3 minutos. El tiempo de investigación de agua fue tomado como una respuesta neutra. Los tiempos mayores o menores de la respuesta neutral se interpretaron como atracción o repulsión respectivamente REF. El índice de huida se calculo dividiendo en número cambios súbitos de la orientación de la cabeza al acercarse al papel filtro entre el total de acercamientos.

### **10.7 Análisis estadístico**

Las graficas fueron realizadas en Excel y Origin Lab 7. Las pruebas estadísticas en los programas SYSTAT y GraphPad Prism 5. La prueba Shapiro-Wilk se utilizo en cada conjunto de datos para determinar si seguían una distribución normal. Para el conteo de células y axones perdidos realizados pruebas paramétrica ya que cumplieron el criterio de normalidad; ANOVA seguida de post hoc Tukey y t-student se usaron respectivamente. Para el número de glomérulos por hemibulbo y tiempo de investigación de la prueba de preferencia se utilizaron pruebas no paramétricas ya que no cumplieron el criterio de normalidad; Kruskal-Wallis seguida de post hoc Dunn and Mann-Whitney fueron usadas respectivamente. Para datos no paramétricos pareados de la prueba de discriminación se utilizó la prueba de Wilcoxon. Finalmente las posiciones de los glomérulos fueron analizadas con dos pruebas: la prueba Levene para evaluar diferencias en la varianza de la distancia Euclidiana. La comparación de conjuntos de coordenadas se realizó analizando los dos ejes por separado y corrigiendo para múltiples comparaciones con Bonferroni (Levine, 2010).

## **11 Referencias**

- Apicella A, Yuan Q, Scanziani M, Isaacson JS (2010) Pyramidal cells in piriform cortex receive convergent input from distinct olfactory bulb glomeruli. *J Neurosci* 30:14255-14260.
- Araneda RC, Kini AD, Firestein S (2000) The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nat Neurosci* 3:1248-1255.
- Araneda RC, Peterlin Z, Zhang X, Chesler A, Firestein S (2004) A pharmacological profile of the aldehyde receptor repertoire in rat olfactory epithelium. *J Physiol* 555:743-756.

- Barker JM, Boonstra R, Wojtowicz JM (2011) From pattern to purpose: how comparative studies contribute to understanding the function of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 34:963-977.
- Belluscio L, Katz LC (2001) Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. *J Neurosci* 21:2113-2122.
- Bergman U, Brittebo EB (1999) Methimazole toxicity in rodents: covalent binding in the olfactory mucosa and detection of glial fibrillary acidic protein in the olfactory bulb. *Toxicol Appl Pharmacol* 155:190-200.
- Bergman U, Ostergren A, Gustafson AL, Brittebo B (2002) Differential effects of olfactory toxicants on olfactory regeneration. *Arch Toxicol* 76:104-112.
- Bergstrom U, Giovanetti A, Piras E, Brittebo EB (2003) Methimazole-induced damage in the olfactory mucosa: effects on ultrastructure and glutathione levels. *Toxicol Pathol* 31:379-387.
- Bozza T, Feinstein P, Zheng C, Mombaerts P (2002) Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *J Neurosci* 22:3033-3043.
- Bozza T, McGann JP, Mombaerts P, Wachowiak M (2004) In vivo imaging of neuronal activity by targeted expression of a genetically encoded probe in the mouse. *Neuron* 42:9-21.
- Burd GD (1993) Morphological study of the effects of intranasal zinc sulfate irrigation on the mouse olfactory epithelium and olfactory bulb. *Microsc Res Tech* 24:195-213.
- Carey RM, Verhagen JV, Wesson DW, Pirez N, Wachowiak M (2009) Temporal structure of receptor neuron input to the olfactory bulb imaged in behaving rats. *J Neurophysiol* 101:1073-1088.
- Cavallin MA, Powell K, Biju KC, Fadool DA (2010) State-dependent sculpting of olfactory sensory neurons is attributed to sensory enrichment, odor deprivation, and aging. *Neurosci Lett* 483:90-95.
- Costanzo RM (1984) Comparison of neurogenesis and cell replacement in the hamster olfactory system with and without a target (olfactory bulb). *Brain Res* 307:295-301.
- Costanzo RM (1985) Neural regeneration and functional reconnection following olfactory nerve transection in hamster. *Brain Res* 361:258-266.
- Costanzo RM (1991) Regeneration of olfactory receptor cells. *Ciba Found Symp* 160:233-242; discussion 243-238.
- Costanzo RM (2000) Rewiring the olfactory bulb: changes in odor maps following recovery from nerve transection. *Chem Senses* 25:199-205.
- Chen WR, Shepherd GM (2005) The olfactory glomerulus: a cortical module with specific functions. *J Neurocytol* 34:353-360.
- Christensen MD, Holbrook EH, Costanzo RM, Schwob JE (2001) Rhinotomy is disrupted during the re-innervation of the olfactory bulb that follows transection of the olfactory nerve. *Chem Senses* 26:359-369.
- Davison IG, Ehlers MD (2011) Neural circuit mechanisms for pattern detection and feature combination in olfactory cortex. *Neuron* 70:82-94.
- Ducray A, Bondier JR, Michel G, Bon K, Millot JL, Propper A, Kastner A (2002) Recovery following peripheral destruction of olfactory neurons in young and adult mice. *Eur J Neurosci* 15:1907-1917.
- Ferretti P (2011) Is there a relationship between adult neurogenesis and neuron generation following injury across evolution? *Eur J Neurosci* 34:951-962.
- Fleischmann A, Shykind BM, Sosulski DL, Franks KM, Glinka ME, Mei DF, Sun Y, Kirkland J, Mendelsohn M, Albers MW, Axel R (2008) Mice with a "monoclonal nose": perturbations in an olfactory map impair odor discrimination. *Neuron* 60:1068-1081.
- Ghosh S, Larson SD, Hefzi H, Marnoy Z, Cutforth T, Dokka K, Baldwin KK (2011) Sensory maps in the olfactory cortex defined by long-range viral tracing of single neurons. *Nature* 472:217-220.
- Harkema JR, Carey SA, Wagner JG (2006) The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol Pathol* 34:252-269.

- Imai T, Suzuki M, Sakano H (2006) Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science* 314:657-661.
- Imai T, Yamazaki T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Abe T, Suzuki M, Sakano H (2009) Pre-target axon sorting establishes the neural map topography. *Science* 325:585-590.
- Iwema CL, Fang H, Kurtz DB, Youngentob SL, Schwob JE (2004) Odorant receptor expression patterns are restored in lesion-recovered rat olfactory epithelium. *J Neurosci* 24:356-369.
- John JA, Key B (2003) Axon mis-targeting in the olfactory bulb during regeneration of olfactory neuroepithelium. *Chem Senses* 28:773-779.
- Johnson BA, Leon M (2000) Modular representations of odorants in the glomerular layer of the rat olfactory bulb and the effects of stimulus concentration. *J Comp Neurol* 422:496-509.
- Johnson BA, Leon M (2007) Chemotopic odorant coding in a mammalian olfactory system. *J Comp Neurol* 503:1-34.
- Johnson BA, Woo CC, Leon M (1998) Spatial coding of odorant features in the glomerular layer of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 393:457-471.
- Johnson BA, Xu Z, Ali SS, Leon M (2009) Spatial representations of odorants in olfactory bulbs of rats and mice: similarities and differences in chemotopic organization. *J Comp Neurol* 514:658-673.
- Kerr MA, Belluscio L (2006) Olfactory experience accelerates glomerular refinement in the mammalian olfactory bulb. *Nat Neurosci* 9:484-486.
- Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, Ikawa M, Okabe M, Ikeda T, Itohara S, Kikusui T, Mori K, Sakano H (2007) Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* 450:503-508.
- Kobayashi M, Costanzo RM (2009) Olfactory nerve recovery following mild and severe injury and the efficacy of dexamethasone treatment. *Chem Senses* 34:573-580.
- Lazarini F, Lledo PM (2011) Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends Neurosci* 34:20-30.
- Leung CT, Coulombe PA, Reed RR (2007) Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci* 10:720-726.
- Levine N (2010) Appendix B: Some Notes on the Statistical Comparison of Two Samples. In: *CrimeStat: A Spatial Statistics Program for the Analysis of Crime Incident Locations*. Houston, TX.
- Mandiyani VS, Coats JK, Shah NM (2005) Deficits in sexual and aggressive behaviors in *Cnga2* mutant mice. *Nat Neurosci* 8:1660-1662.
- Miyamichi K, Serizawa S, Kimura HM, Sakano H (2005) Continuous and overlapping expression domains of odorant receptor genes in the olfactory epithelium determine the dorsal/ventral positioning of glomeruli in the olfactory bulb. *J Neurosci* 25:3586-3592.
- Miyamichi K, Amat F, Moussavi F, Wang C, Wickersham I, Wall NR, Taniguchi H, Tasic B, Huang ZJ, He Z, Callaway EM, Horowitz MA, Luo L (2011) Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. *Nature* 472:191-196.
- Mombaerts P (2001) How smell develops. *Nat Neurosci* 4 Suppl:1192-1198.
- Mombaerts P (2004a) Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited. *Curr Opin Neurobiol* 14:31-36.
- Mombaerts P (2004b) Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci* 5:263-278.
- Mombaerts P (2006) Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:713-737.
- Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675-686.
- Mori K, Takahashi YK, Igarashi K, Nagayama S (2005) Odor maps in the dorsal and lateral surfaces of the rat olfactory bulb. *Chem Senses* 30 Suppl 1:i103-104.
- Mori K, Takahashi YK, Igarashi KM, Yamaguchi M (2006) Maps of odorant molecular features in the Mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 86:409-433.

- Munger SD, Leinders-Zufall T, Zufall F (2008) Subsystem Organization of the Mammalian Sense of Smell. *Annu Rev Physiol*.
- Murdoch B, Roskams AJ (2007) Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology. *J Mol Histol* 38:581-599.
- Papes F, Logan DW, Stowers L (2010) The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell* 141:692-703.
- Potter SM, Zheng C, Koos DS, Feinstein P, Fraser SE, Mombaerts P (2001) Structure and emergence of specific olfactory glomeruli in the mouse. *J Neurosci* 21:9713-9723.
- Sakano H (2010) Neural map formation in the mouse olfactory system. *Neuron* 67:530-542.
- Schwob JE (2002) Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec* 269:33-49.
- Schwob JE (2005) Restoring olfaction: a view from the olfactory epithelium. *Chem Senses* 30 Suppl 1:i131-132.
- Schwob JE, Youngentob SL, Mezza RC (1995) Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion. *J Comp Neurol* 359:15-37.
- Schwob JE, Youngentob SL, Ring G, Iwema CL, Mezza RC (1999) Reinnervation of the rat olfactory bulb after methyl bromide-induced lesion: timing and extent of reinnervation. *J Comp Neurol* 412:439-457.
- Serizawa S, Miyamichi K, Takeuchi H, Yamagishi Y, Suzuki M, Sakano H (2006) A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell* 127:1057-1069.
- Shepherd GM (2004) *The Synaptic Organization of the Brain*, Fifth edition Edition. New York: OXFORD.
- Sosulski DL, Bloom ML, Cutforth T, Axel R, Datta SR (2011) Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. *Nature* 472:213-216.
- Stettler DD, Axel R (2009) Representations of odor in the piriform cortex. *Neuron* 63:854-864.
- Stokes CC, Isaacson JS (2010) From dendrite to soma: dynamic routing of inhibition by complementary interneuron microcircuits in olfactory cortex. *Neuron* 67:452-465.
- Stopfer M, Jayaraman V, Laurent G (2003) Intensity versus identity coding in an olfactory system. *Neuron* 39:991-1004.
- Stowers L, Logan DW (2010) Olfactory mechanisms of stereotyped behavior: on the scent of specialized circuits. *Curr Opin Neurobiol* 20:274-280.
- Suzukawa K, Kondo K, Kanaya K, Sakamoto T, Watanabe K, Ushio M, Kaga K, Yamasoba T (2011) Age-related changes of the regeneration mode in the mouse peripheral olfactory system following olfactotoxic drug methimazole-induced damage. *J Comp Neurol* 519:2154-2174.
- Takeuchi H, Inokuchi K, Aoki M, Suto F, Tsuboi A, Matsuda I, Suzuki M, Aiba A, Serizawa S, Yoshihara Y, Fujisawa H, Sakano H (2010) Sequential arrival and graded secretion of Sema3F by olfactory neuron axons specify map topography at the bulb. *Cell* 141:1056-1067.
- Treloar HB, Feinstein P, Mombaerts P, Greer CA (2002) Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *J Neurosci* 22:2469-2477.
- Uchida N, Takahashi YK, Tanifuji M, Mori K (2000) Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nat Neurosci* 3:1035-1043.
- Valle-Leija P, Blanco-Hernandez E, Drucker-Colin R, Gutierrez-Ospina G, Vidaltamayo R (2012) Supernumerary formation of olfactory glomeruli induced by chronic odorant exposure: a constructivist expression of neural plasticity. *PLoS One* 7:e35358.
- Verhagen JV, Wesson DW, Netoff TI, White JA, Wachowiak M (2007) Sniffing controls an adaptive filter of sensory input to the olfactory bulb. *Nat Neurosci* 10:631-639.
- Wachowiak M, Cohen LB (2001) Representation of odorants by receptor neuron input to the mouse olfactory bulb. *Neuron* 32:723-735.



- Walz A, Omura M, Mombaerts P (2006) Development and topography of the lateral olfactory tract in the mouse: imaging by genetically encoded and injected fluorescent markers. *J Neurobiol* 66:835-846.
- Wang F, Nemes A, Mendelsohn M, Axel R (1998) Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 93:47-60.
- Wilson RI, Mainen ZF (2006) Early events in olfactory processing. *Annu Rev Neurosci* 29:163-201.
- Willhite DC, Nguyen KT, Masurkar AV, Greer CA, Shepherd GM, Chen WR (2006) Viral tracing identifies distributed columnar organization in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12592-12597.
- Yee KK, Costanzo RM (1995) Restoration of olfactory mediated behavior after olfactory bulb deafferentation. *Physiol Behav* 58:959-968.
- Yee KK, Costanzo RM (1998) Changes in odor quality discrimination following recovery from olfactory nerve transection. *Chem Senses* 23:513-519.
- Youngentob SL, Schwob JE, Sheehe PR, Youngentob LM (1997) Odorant threshold following methyl bromide-induced lesions of the olfactory epithelium. *Physiol Behav* 62:1241-1252.
- Zou DJ, Feinstein P, Rivers AL, Mathews GA, Kim A, Greer CA, Mombaerts P, Firestein S (2004) Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Science* 304:1976-1979.

## 12 Apéndice

Aceptado Agosto 31 2012, PlosOne

# Odor Memory Stability after Reinnervation of the Olfactory Bulb

Eduardo Blanco-Hernández<sup>1</sup>, Pablo Valle-Leija<sup>1</sup>, Viviana Zomosa-Signoret<sup>2</sup>, René Drucker-Colín<sup>1</sup> and Román Vidaltamayo<sup>3†</sup>.

1. Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México
2. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León México
3. Departamento de Ciencias Básicas, Centro de Diagnóstico Molecular y Medicina Personalizada, Universidad de Monterrey, Nuevo León, México.

### †Corresponding Author:

E-mail: rvidaltamayo@udem.edu.mx  
Centro de Diagnóstico Molecular y Medicina Personalizada  
Departamento de Ciencias Básicas  
Universidad de Monterrey  
San Pedro Garza García, Nuevo León  
66238 Mexico,

## Abstract

The olfactory system, particularly the olfactory epithelium, presents a unique opportunity to study the regenerative capabilities of the brain, because of its ability to recover after damage. In this study, we ablated olfactory sensory neurons with methimazole and followed the anatomical and functional recovery of circuits expressing genetic markers for I7 and M72 receptors (M72-IRES-tau-LacZ and I7-IRES-tau-GFP). Our results show that 45 days after methimazole-induced lesion, axonal projections to the bulb of M72 and I7 populations are largely reestablished. Furthermore, regenerated glomeruli are re-formed within the same areas as those of control, unexposed mice. This anatomical regeneration correlates with functional recovery of a previously learned odorant-discrimination task, dependent on the cognate ligands for M72 and I7. Following regeneration, mice also recover innate responsiveness to TMT and urine. Our findings show that regeneration of neuronal circuits in the olfactory system can be achieved with remarkable precision and underscore the importance of glomerular organization to evoke memory traces stored in the brain.

## Introduction

The olfactory system offers a unique opportunity to study the mechanisms of neuronal regeneration. Lying on the olfactory epithelia (OE), olfactory sensory neurons (OSNs) are responsible for the initial process of odorant detection. This neuronal population is replaced continuously during adult life [1, 2, 3]. Several studies have shown the remarkable capability of regeneration of OSNs in the OE and reinnervation of their postsynaptic targets in the olfactory bulb (OB) after diverse insults [4-7]. Moreover, the organization of neuronal circuits within the OE and OB allows for monitoring of anatomical and functional recovery after damage [1]. Each OSN expresses only one of ~1000 possible olfactory receptors (ORs) [8-11]. All the OSNs expressing a specific OR innervate the same area of the OB, where their axons coalesce and form functional circuits called glomeruli.

For each population of OSNs, there is at least one glomerulus lying on the lateral side and one on the medial side of the OB [12-16]. This topographic organization of glomeruli is stereotyped among individuals [17-21]. Glomeruli constitute an anatomical feature that organizes the incoming sensory inputs to the OB: An odorant molecule activates a variety of ORs and every OR recognizes several chemically-related odorant molecules [22-25], but a specific set of glomeruli is activated by a particular odorant mixture

[14, 26-31]. Hypothetically, these maps of glomerular activation are closely related to the subsequent neural processing that defines the identity and possibly the qualities of odor molecules [32, 33, 34]. Supporting this hypothesis, studies inducing the degeneration of the OE have shown that the precise glomerular organization is severely disrupted after re-innervation of the OB [1, 5, 35-37]. These alterations in the glomerular circuit correlate with loss of learned olfactory tasks [38], without affecting the basic function of detection and discrimination of odorants [39, 40]. However, it is not clear whether the loss of olfactory performance is caused by distorted glomerular maps, or due to memory loss produced by changes in circuitry after denervation of sensory fibers.

In this context, new models of OSN regeneration that allow a better recovery of the glomerular organization are necessary to clarify the role that glomerular activated maps have during perception of odorants and recall of memory tasks associated to those same odorants. Here, we used the anti-thyroid drug methimazole to induce degeneration of the OE in knock-in mice expressing genetic markers for the M72 and I7 receptors (M72-IRES-tau-LacZ and I7-IRES-tau-GFP). Contrary to other models of degeneration [6], methimazole preserves the integrity of the lamina propria (LP) and cribriform plate, which are essential for sensory axon fasciculation and extension during re-

innervation of the bulb. We analyzed the regenerative capability of OSN populations as well as the precision of glomerular re-innervation, and examined the functional implications of glomerular circuitry regeneration for learned and innate olfactory behavior.

## Results

### M72 circuits are restored after methimazole treatment

The temporal course of axonal regeneration of neurons expressing the M72 receptor was followed during 45 days after methimazole administration. Figure 1 shows the medial aspect of the nasal cavity and olfactory bulb of M72-IRES-tauLacZ mice. These M72-expressing OSNs are located in the dorsal portion of the nasal turbinates. Their axons project to the dorsal aspect of the olfactory bulb, where they coalesce into glomeruli [43, 44]. Virtually all M72-positive OSNs were ablated five days after methimazole administration (Fig. 1F). Ten days after methimazole exposure almost no M72-positive cell bodies could be detected on the surface of the turbinates (Fig. 1B), while blue-stained axon fibers remained visible on the OB. The number of M72-expressing neurons gradually recovered after methimazole administration (Fig. 1F, see below). The distribution of M72-positive neurons on the dorsal part of the turbinates was reestablished, similarly to what has been reported with other methods of OE ablation [45]. Strikingly, at 45 days post-lesion, the pattern of projection of the M72 circuit was qualitatively similar to the control condition, even though some axons were located off-target (Fig. 1E).

### The entire population of M72 neurons is recovered after methimazole treatment

To accurately determine the extent of OSNs loss and recovery after methimazole treatment, we evaluated OE histological sections from M72-IRES-tau-LacZ mice to quantify X-gal stained neurons. Figure 2 shows representative images of coronal sections of the olfactory turbinates at 10 and 45 days post lesion. Ten

days after methimazole exposure, nearly all M72-positive neurons were eliminated ( $7.6 \pm 0.5$  vs.  $0.1 \pm 0.05$  cells/mm length, control vs. 10 days post lesion; mean  $\pm$  SEM;  $P < 0.0001$ , Fig. 2B). Remarkably, X-gal stained axons remained visible within the *lamina propria* (Fig. 2B right panel), confirming what we observed in the whole mount preparations. The entire M72-positive population is renewed in the OE 45 days after methimazole treatment ( $7.6 \pm 0.5$  vs.  $7.5 \pm 0.4$ , cells/mm length, control vs. 45 days post lesion;  $P > 0.05$ , Fig. 2D). We also measured the thickness of olfactory epithelia and observed a significant decrease 10 days post-lesion ( $96.67 \pm 4.8$  vs.  $42.04 \pm 1.2$   $\mu\text{m}$ , control and 10 days post-lesion;  $P < 0.0001$ , Fig 2E). No statistical difference in thickness was found 45 days post-lesion ( $96.67 \pm 4.8$  vs.  $87.06 \pm 2.8$   $\mu\text{m}$ , control vs. 45 days post-lesion;  $P > 0.05$ ). No evidence of metaplasia or damage to the underlying structures of the epithelia was observed 45 days post-ablation.

### Location of M72 glomeruli is restored after regeneration

In order to refine our observations on the projection patterns of these regenerated circuits, we performed spatial analysis of the position of glomerular structures on the dorsal portion of the OB from control and regenerated mice. Figure 3 shows representative images of the dorsal aspect of the olfactory bulb of control (3A) and regenerated mice (3B). Forty-five days after methimazole treatment, the innervation pattern of regenerated M72 axons to the olfactory bulb was very similar to the one observed in control animals. To better describe the position of glomeruli after regeneration, images were normalized to the average size of the OB (see Materials and Methods). Figure 3C shows normalized bulbs and the position of glomeruli observed in control (blue dots) and methimazole-treated mice (orange dots). First, we assessed differences in projection precision by analyzing the dispersion of glomeruli around the mean position by use of Euclidean distance measures (see Material and Methods). As shown in figure 3D, there were no significant differences in the variance of the Euclidean distance to the mean glomerular position between both

animal groups ( $P>0.05$ ). To evaluate differences in projection accuracy, the mean position of regenerated glomeruli was examined. Figure 3E shows the summary of the relative position of all glomeruli projected on a single virtual plane representing the dorsal portion of the right hemibulb (images from the left hemibulbs were mirror-inverted digitally and projected on the same plane for analysis purposes). There were no significant differences in glomerular positions between control and regenerated animals ( $n=32$  and  $n=42$ , respectively) (Fig. 3F,  $P>0.05$ ).

On the other hand, we observed a small but significant, increase in the number of M72 glomeruli present on the dorsal surface of regenerated bulbs 45 days after methimazole exposure ( $1.24\pm 0.4$  vs.  $1.8\pm 0.7$ , glomeruli/hemibulb, control vs. regenerated animals;  $P<0.05$ , Fig. 4A). This increased number of glomeruli persisted 90 days after methimazole injection, contrasting with the refinement process observed during neonatal development, where supernumerary glomeruli tend to disappear over time [46]. The frequency distribution of lateral glomeruli per hemibulb illustrates an increase in glomeruli numbers (Fig. 4B). To further explore the refinement of mistargeted projections to the bulb after regeneration, we analyzed the position of those axons on the dorsal OB. Figure 4C shows a representative image of regenerated, mistargeted M72 axons, most of them single fibers not coalescing with other major M72-positive glomeruli (arrows). In overlapped images, obtained 45 and 90 days post-methimazole ablation, no apparent differences in the location patterns and axon numbers were observed (figure 4C right and 4D).

### **I7 circuits are also restored after methimazole administration**

To determine if our findings on olfactory circuit regeneration were restricted to the M72 population or, on the other hand, could be observed in other areas of the bulb, we studied the degree of regeneration of the I7 glomerular circuit located on the ventral region of the OB [24, 25]. We analyzed seven mice, 3 in the control and 4 in the experimental group, expressing the

histological genetic marker tauGFP in I7-positive OSNs (I7-IRES-tauGFP). The regenerated projections to glomeruli were studied 45 days after methimazole injection. Figure 5 shows representative images of serial, coronal OB slices OB from age-matched control animals (Fig. 5A) and 45 days after methimazole-exposure (Fig. 5B). Images show serial sections of the anteroventral region of the OB (see methods) where the lateral glomerulus is located. Projections of GFP positive axons in control mice innervated this area and formed one single glomerulus (arrow in Fig. 5A and inset). After regeneration, the GFP-positive axons projected to the same area and entered in to the glomerular layer similarly to control animals. However, axons innervated two adjacent glomeruli (arrows in Fig. 5B, and inset). Also innervation to some glomeruli appeared irregular (Fig. 5B, arrow right), since the GFP fibers did not fill the entire glomeruli. The same projection pattern was observed consistently in all tested mice.

### **A learned odor-guided task is recalled after regeneration**

We evaluated the extent of functional recovery and preservation of odor-dependent memories following reinnervation by a learned odor-discrimination task. We focused in odor molecules known to activate glomerular circuits in diverse zones along the OB including the cognate ligands for M72 and I7 receptors (acetophenone and heptaldehyde, respectively) [24, 47]. Twenty-four mice were randomly separated into two groups and each group was tested with different pairs of odorants, acetophenone vs citral (Group 1) or heptaldehyde vs 2-heptanone (Group 2). The task consisted in associating the presence of given odorant in the environment with receiving water as a reward (details in Material and Methods). Figure 6A illustrates a diagram of the maze and the experimental design. Figures 6B and 6C show the performance of Group 1 and Group 2 in both (blue dots represent data from the rewarded arm of the maze (i.e. the zone with the water reward and the specific odorant; +arm, blue dots) and the not-rewarded arm (-arm, red dots). Control groups retained the ability to discriminate the odorants even

when tested 45 days after finalizing the training period (Group 1:  $0.7\pm 0.04$  vs.  $0.12\pm 0.03$ , efficiency score in +arm vs. -arm;  $P<0.05$ . Group 2:  $0.7\pm 0.03$  vs.  $0.8\pm 0.01$ ;  $P<0.05$ ). Animals from the methimazole-treated (EXP) group were unable to discriminate the different odorants 10 days after injection (Group 1:  $0.45\pm 0.1$  vs.  $0.43\pm 0.2$ , efficiency score in +arm vs. -arm;  $P>0.05$ . Group 2:  $0.57\pm 0.09$  vs.  $0.37\pm 0.09$ ;  $P>0.05$ ). This observation correlates well with the absence of olfactory sensory neurons in the OE at 10 days after methimazole injection (Fig. 2). Remarkably, the EXP Group recovered the ability to discriminate the odorants 45 days after lesion (Group 1:  $0.7\pm 0.06$  vs.  $0.2\pm 0.04$ , efficiency score in +arm vs. -arm;  $P<0.05$ . Group 2:  $0.60\pm 0.08$  vs.  $0.2\pm 0.04$ ;  $P<0.05$ ).

### **Innate odor-dependent behavior is partially recovered after regeneration**

Previous studies have shown that the main OB mediates the innate response to some odorants, such as the aversive response to Trimethyl-thiazoline (TMT, a compound present in fox feces [41]) and the attractant response to urine [47, 48]. Thus, we decided to further explore the functional recovery after methimazole treatment by evaluating the innate behavior elicited by these odorants in a preference task. We hypothesized that reestablishment of glomerular circuit organization following methimazole-induced ablation could lead to recovery of innate responses to odorants.

Mice were exposed to TMT or urine –scented filter paper and the animal's investigation time was measured during 3-min periods. Figure 7A shows the investigation time for the different odorants 45 days after methimazole exposure and from age-matched control male mice. Female urine elicited strong attraction in control as well as in regenerated mice ( $33.4\pm 2.8$  vs.  $19.1\pm 5.1$  s, control vs. regenerated animals;  $P>0.05$ ,  $n=6$  per group). Also, we observed that they were able to mate with no evident problems (data not shown). In contrast, although TMT elicited repulsive behavior in regenerated mice (Figure 7A), the investigation time was significantly increased in

regenerated mice ( $0.8\pm 0.1$  vs.  $2.4\pm 0.7$  s, control vs. regenerated animals;  $P<0.01$ ,  $n=6$  per group). Moreover, withdrawal index (times mouse head abruptly changed direction/times the mouse approached the stimulus) from TMT was drastically decreased in regenerated mice ( $0.89\pm 0.06$  vs.  $0.1\pm 0.04$  s, control vs. regenerated mice;  $P<0.01$ ,  $n=6$  per group. Figure 7B).

## **Discussion**

This study shows for the first time that the process of regeneration after extensive damage of the OSNs is precise enough to restore the major features of specific glomerular circuits. Furthermore, this anatomical recovery of olfactory circuits allows recalling of odorant-dependent memories.

### **Neuronal regeneration after methimazole injection**

Different strategies have been used to ablate OSNs, such as surgical axon lesion, gas exposure, detergent irrigation, and systemic injection of toxins [4, 5, 36, 49, 50]. In every case, OSNs can regenerate in the OE and sensory axons maintain the ability to recreate circuits in the OB. At the OE level, the dorso-ventral organization of the different OSNs populations is completely restored [45]. However, these methods damage the LP and produce metaplasia of supportive tissue of the OE [5, 6]. At the OB, few axon fibers reach the dorsal part [5] and the specific glomerular organization is disrupted [36, 37].

In this study, we administrated methimazole systemically to ablate the OSNs. Previous studies have demonstrated that methimazole is metabolized by a cytochrome P450 in sustentacular cells and Bowman glands, causing massive apoptosis and promoting the degeneration of OE supportive cells [6, 51, 52]. This leads to detachment of OSNs while progenitor cells remain intact [53]. Contrary to other methods, methimazole lesions induce minimal damage to the LP with no evident metaplasia of the OE [6]. The structure

of the LP has an important role in axon navigation in the olfactory system. Axon bundles pack together and run through the LP and they grow and innervate the OB [54].

Recent studies demonstrate that sensory axons are presorted before they reach the OB. This early organization is crucial for correct targeting of glomeruli [55]. Therefore, after an extensive damage, the structural integrity of the LP is essential for navigation of new axons. Here, we report that 45 days after methimazole administration the major features of M72 and I7 glomerular circuits are recovered. Most of the newly regrown axons innervate the dorsal and ventral aspects of the olfactory bulb and coalesce in few glomerular structures. Thus, it is possible that the main cause for the alterations in the pattern of projection reported in other studies is damage to the LP. Similar complete anatomical recovery of P2-olfactory glomeruli can be observed few weeks after inducing selective degeneration of P2-expressing sensory neurons, with no visible off-target projections [56]. However, our results show less robust recovery of OR-expressing OSN populations and more off-target axons. The context of massive regeneration occurring in our model could account for these differences.

Interestingly, we observe X-gal stained (M72) axons on the OB surface even where no OR-positive cellular bodies can be observed within the OE. Although we cannot rule out the possibility that some cells escaped ablation, our cell counting experiments suggest that these fibers are remnants of axons in which the degeneration process has not been completed. The fact that X-gal positive axons do not completely disappear from the olfactory system suggests that the process of neuron degeneration and recovery occurs so fast that new and remnant axons coexist in time. It is possible, therefore, that those residual axons could guide the rewiring process. This important issue must be addressed in future studies.

### **Regeneration of glomerular structures**

Previous studies have measured the variability of the glomerular position in several olfactory circuits [21, 57, 58], with variations ranging from 100 to 700  $\mu\text{m}$ . Here we reported a variability of less than 150  $\mu\text{m}$  of the M72 lateral glomeruli, after image normalization. This variability is consistent with other studies where the relative position is normalized with respect to a functionally identified glomerulus or adjacent tagged glomeruli [58, 21]. We focused on two aspects to determine the location of regenerated glomeruli: precision and accuracy. Precision reflects the intrinsic variation of projections of sensory neurons and the accuracy reflects the stereotypic position of glomeruli on the OB, reflected by the differences in location of regenerated glomeruli. We show that despite the increased number of glomeruli in the lateral hemibulb, there is no change in the precision and accuracy of glomeruli position after regeneration. This result strongly suggests that the mechanism that guides sensory fibers to their final location in the bulb is present in the adult mice and is similar to the one observed during development. Contrasting to postnatal development of glomerular circuits [46], refinement of regenerated circuits of adult mice is absent even 90 days after methimazole administration. Furthermore, the innervation of I7 glomeruli after regeneration appears irregular and possibly heterogeneous, i.e. it is likely that fibers from different OSN populations co-exist in some regenerated glomeruli, similarly to the initial steps in its formation during normal development [46]. Overall, our observations demonstrate that some mechanisms of axonal navigation and targeting persist from development to adult stage of the murine olfactory system; while others, chiefly those determining circuitry refinement, are absent.

### **Odor memory and regenerated glomerular circuits**

Previous studies have shown that olfactory function is recovered after regeneration of the olfactory system [38, 39, 59]. Discrimination capability recovers 15 days after lesion and the temporal course of learning of odorant-dependent task learning is identical between naive mice and those that have recovered from a

lesion [38, 40]. However, regenerated animals are not able to recall a learned odorant-dependent task [38]. This phenomenon has been explained by alterations in the perceptual identity of odors produced by changes in the spatial organization of glomerular circuits.

Our results show that after methimazole administration, there is a remarkable restoration of the projection patterns of M72 and I7 circuits; which correlates with high success in recalling learned olfactory-dependent behavioral tasks, clued by the cognate ligands of M72 and I7 receptors (acetophenone and heptaldehyde, respectively). Although our anatomical analysis focuses only on M72 and I7 circuits, our behavioral data could suggest a similar degree of regeneration in other glomeruli. Moreover, the set of odorants used in this study has different molecular profiles and activates different regions along the OB: 2-heptanone activates the antero-dorsal [60], heptaldehyde the antero-ventral and dorso-medial regions of the bulb [61]. On the other odorant set, acetophenone [47] and citral [62] elicit responses in separate areas within the postero-dorsal bulb. Thus, it is likely that following the administration of methimazole the circuits responsible of recognition of all these odorants are reestablished as well.

Our results demonstrate that the disruption of glomerular organization on the OB observed in previous studies is the main cause of the loss of learned odorant-dependent behaviors after regeneration and underscore the importance of initial processing and segregation of olfactory information within the bulb for correct odorant identification and discrimination, which is necessary for the correct recall of memories associated with olfaction. Nevertheless, the behavioral tests used here differ from those used in previous studies and we cannot rule out that other subtle changes in olfactory performance occur, such as those observed with genetic models [47].

### **Innate responses to odorants after regeneration**

It has been shown that odorants can induce stereotypic behavioral responses in mice. During these responses,

odorants are recognized simultaneously by the vomeronasal system, trigeminal and the main olfactory systems (i.e., the OE) [63]. It has been demonstrated that neural processing of aversive responses to TMT is performed by a set of glomeruli located specifically in the dorso-medial area of the OB. These circuits relay information to the bed nucleus of the stria terminalis (BNST), which is crucial for the repulsive behavior elicited by TMT [41]. Moreover, mice lacking the transient receptor potential channel (TRPC2), a crucial component in the sensory response of vomeronasal neurons, show no alterations in aversive response to TMT [64]. Therefore, aversion of regenerated mice to TMT suggests that the circuits responsible recover within the main olfactory system (OE and OB). However, the repulsive behavior elicited by TMT is altered in regenerated animals: mainly, the withdrawal response decreases significantly in comparison to control animals. These results could be explained to some degree by modifications in the centrifugal innervation of the OB or even to the BNST. Since it has been suggested that TMT could stimulate the trigeminal system [65], we cannot discard alterations to this system after methimazole exposure that could explain our results. Additional experiments are required to resolve this issue.

On the other hand, olfactory behavioral studies using female urine as an attractive clue for male mice demonstrate that the main olfactory system is determinant for its detection and for the elicited behavioral response [48]. Mice lacking the cyclic nucleotide gated channel (CNG2), crucial in the sensory response of OSN, disrupt the attractive and mating behavior elicited by urine, without altering the vomeronasal neurons response to it [66]. However, modifications in the organization of olfactory glomeruli in the main OB do lead to mating disruption [47]. Here we show that after regeneration there is no difference in the attraction response to urine (Fig. 7) or mating behavior (data not shown). Taken together, our results demonstrate that the specific glomerular organization in the OB is largely recovered after methimazole treatment.

In summary, we have demonstrated two important aspects of the olfactory system. First, the olfactory system has an enormous capacity to restore the general organization of the glomerular circuits after an extensive damage to the OSNs. Second, the organization of sensory inputs in the OB is important to determine the identity of odors and recovery of this organization is sufficient to recall memory traces associated with olfactory cues. Stability of these memory traces is not contingent upon persistent sensory input and can be reactivated when sensory input is re-established in the olfactory system.

## **Material and Methods**

### **Animals**

Homozygous M72-IRES-tauLacZ and I7-IRES-tauGFP adult mice (6-9 weeks old) in a C57BL6 x CBL5 genetic background were used for these experiments. All animals were maintained in a 12/12 light-dark cycle. Animal procedures followed the National Institutes of Health (NIH) guidelines for care and use of experimental animals (NIH approval number A5281-01). The protocols were revised and approved by the local animal rights committee of the Universidad Nacional Autónoma de México. Mouse strains were a generous gift from Dr. Peter Mombaerts.

### **Ablation of olfactory sensory neurons and X-gal staining**

A single intraperitoneal injection of methimazole (Sigma, 0.1mg/g mouse weight) in vehicle solution (phosphate buffer –PBS– 0.1 M, 10% dimethyl sulfoxide –DMSO–) was administered to ablate the olfactory epithelium. Control animals received a single vehicle injection. For tissue preparation, mice were first anesthetized with sodium pentobarbital and perfused intracardially with cold PBS, followed by freshly prepared paraformaldehyde (PFA 4% in PBS). Whole-head mounts were post-fixed in cold PFA for 1hr and dissected to expose either the medial aspect of the nasal turbinates or the dorsal aspect of the olfactory bulb. For coronal sectioning, whole-head mounts were post-fixed in PFA for 24hr and then decalcified for 3-4

days in 30% sucrose PBS-DEPC 250mM EDTA buffer. Serial slices of 20µm were cut in a Leica cryostat CM1900. For X-gal (bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside, Molecular Probes, Carlsbad, CA) staining, tissue was incubated for 5 hours in buffer containing 100mM phosphate buffer (pH 7.4), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% Nonidet P40, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide and 1 mg/ml of X-gal. Afterwards, the tissue was rinsed for 10 min in PBS (pH 7.4). Images were taken with a stereoscopic microscope Leica EZ4D and digitized with Leica FireCam software. Images were finally adjusted for brightness and contrast with ImageJ software (NIH) with no further manipulation.

### **Cell counting**

To analyze the temporal course of regeneration, M72-IRES-tauLacZ mice were sacrificed 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 45 days after methimazole administration (3-4 mice per group). Following X-gal staining in whole mounts, images from the medial aspect of the turbinates were obtained and X-gal stained cells were counted using the “Analyze Particles” plugin of ImageJ. Cells residing on the right and left part of the turbinates were counted independently and the average cell density (cells/mm<sup>2</sup>) was calculated. Images of the medial aspect of turbinates were filtered through contrast enhancement and background subtraction before analysis. Cell counts in slices followed the same process as in whole mounts. One of every fourth section was collected up to a total of 29 slices. Only the olfactory epithelium was digitally selected in the images for counting procedures. For better comparison, control and experimental animals (45 days after methimazole) were sacrificed at the same age.

### **Position analysis of olfactory lateral glomeruli**

Images from the dorsal aspect of the olfactory bulb were obtained to determine the position of the lateral M72 glomerulus. Animals were grouped in control (n=12) and methimazole-treated mice (n=11). Images



were taken at the same age in both groups, and were normalized to decrease variations in glomerular position related to the differences in bulb size. First, a rectangle delineating the medial, lateral, posterior and anterior edges was traced in each bulb. Then, all the rectangle sizes were averaged and normalized. Finally, the positions of centroids (x, y) of each glomerulus was determined and merged to the normalized plane size. To determine the dispersion of glomeruli, the standard distance was calculated as follows:

$$\text{Standard distance} = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n}}$$

Where d is the Euclidean distance i.e. distance to a given point (x, y) from the average centroid position (x<sub>m</sub>, y<sub>m</sub>) and n is the total number of points. All image transformations were performed using ImageJ software.

## Immunocytochemistry

I7-IRES-tauGFP mice (n=7, 3 control, and 4 experimental) were perfused as described above. After fixation, brains were cryoprotected in PBS + 30% sucrose for 2 days at 4°C. Coronal OB slices (20 μm) were obtained. One of every third slice was collected. Sections were rinsed in 0.1 M PBS and incubated with a blocking solution containing 10% of normal horse serum and 0.3% Triton X-100 for 2 hours. Then, they were incubated with a polyclonal goat anti-GFP antibody (1:1,000, Abcam) for 24 hours at 4°C. Finally, sections were rinsed and incubated for 2 hours with a donkey anti goat-Cy5 secondary antibody (Jackson ImmunoResearch), washed and counterstained with fluorescent DNA stain DAPI (Invitrogen). Images shown in Figure 5 represent, in both cases, the ventro-lateral part of the OB of mice sacrificed at the same age. Sections were obtained approximately 500μm after the beginning of their most anterior part. Images were obtained with a Leica DM6000 vertical microscope and digitized with Leica LAS AF software, and adjusted for brightness and contrast with ImageJ software.

## Behavioral tests

The olfactory discriminatory task performed by M72-IRES-tauLacZ male mice involved a three-armed maze and water-reward design. Mice were randomly divided in two groups. Group 1 had to discriminate acetophenone vs. citral and Group 2 heptaldehyde vs. 2-heptanone. During training, mice were restricted to a water intake of 1-2 ml per day. In the first 2 days of training, mice were habituated for 10 min to a three-arm maze in which water was delivered at the distal end of all three arms. Then for three weeks, one odorant of each pair was associated to the water reward. Odorant was delivered in a cotton ball (200 μl odorant/ball) placed in a hidden compartment on each arm. Two arms were selected to present the non-rewarded odorant (-) (citral or 2-heptanone) and one arm to present the rewarded odorant (+) (heptaldehyde or acetophenone). To minimize the effect of spatial learning, arms were randomly changed from day-to-day. In a training session of 10 minutes, mice explored the maze and water was delivered only in association with the conditioned stimulus in the +arm. During the first week of training, the water reward was delivered at a volume of 50 μl every time the animal made the right selection. The volume of reward was increased by 50 μl every week. To maintain a constant water intake of 1-2 ml per day, the percentage of rewarded trials was adjusted accordingly. After three weeks of training, we evaluated the performance of mice without delivering water (Test-Pre). For this, each mouse was placed inside the maze and behavior was recorded for 5 minutes. The videos were analyzed offline by a person without previous knowledge of the odorants used on each arm. The efficiency score for each arm was calculated by dividing the number of water rewarded entries during session by the total number of entries in that arm performed by each animal. For OE lesion experiments, 12 mice of each group showing efficiency scores ≥ 0.85 in the +arm and ≤ 0.35 in the -arm were selected. Group 1 and Group 2 were divided randomly into control (CTRL, n=6) and experimental groups (EXP, n=6). The EXP group was injected with methimazole two days after Test-Pre and the control group received a vehicle injection. The day of injection

was designated as day 0. Two more evaluations were performed to follow the regeneration process at days 10 (Test 10-Post) and 45 (Test 45-Post). Fresh stock solutions of the odorants dissolved in DMSO were prepared every 10 days. Working solutions were dissolved daily in water to the following concentrations: 50mM citral, 50mM acetophenone, 10mM heptaldehyde and 10mM 2-heptanone. All odorants were purchased from Sigma.

Thirty-six mice were used for the innate preference test. To avoid learning, mice performed the task once and only for one odorant condition. Mice were habituated in a cage (27x17x13cm) for 30 min, then the cage was replaced with a clean one and a piece of filter paper was introduced with fresh female urine (15µl), trimethyl-thiazoline (TMT, 5µl undiluted) or water (15µl). Video recordings were taken and analyzed offline blindly to experimental condition. The investigation time was defined as approaches within 1cm around the filter paper in a 3-minute period. The investigation time around purified water was established as the neutral response. Times greater and lower than the neutral response were interpreted as attraction or repulsion respectively [41]. The withdrawal index was calculated by dividing the number of abrupt changes in head orientation when approaching the filter paper by the total number of approaches.

## Statistical analysis

Graphs were generated with Excel and Origin lab 7. Statistical tests were performed in SYSTAT and GraphPad Prism 5 software. The Shapiro-Wilk test was done for each set of data to determine if they followed

a normal distribution. Then we used parametrical or non-parametrical tests accordingly. For cell and mistargeted axon counts, we used parametrical tests (ANOVA followed by post hoc Tukey and T-student test were used, respectively). For glomeruli per hemibulb counts and innate behavior investigation times, we used non-parametrical tests (Kruskal-Wallis followed by post hoc Dunn and the Mann-Whitney, respectively). For non-parametric paired comparisons in olfactory discrimination data, we used the Wilcoxon test. Finally, glomerular positions were analyzed with two parametrical tests: the Levene test was used to evaluate differences on variance of the Euclidean distance of glomeruli position; then, as suggested by Levine [42], sets of coordinates were compared by analyzing both axis and correcting for multiple comparisons with Bonferroni correction test.

## Acknowledgements

We thank Dr. Peter Mombaerts of the Max Planck Institute of Biophysics Frankfurt, Germany for the generous gift of mice strains. We also thank Diana Millán and Marcela Palomero for their excellent technical assistance. We are grateful to Fernanda Monjaraz for insightful comments to the manuscript. EBH received a Ph.D. fellowship from CONACYT-México. This work is part of the fulfillment of requirements for EBH's Ph.D. degree in Biomedical Science from the Universidad Nacional Autónoma de México. We are indebted to Claudia Rivera and her staff of the animal facility for their assistance and continuous advice. Ana Maria Escalante and Francisco Pérez-Eugenio provided us with excellent computer technical assistance.

## References

1. Schwob JE (2002) Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec* 269: 33-49.
2. Kawauchi S, Beites CL, Crocker CE, Wu HH, Bonnín A, et al. (2004) Molecular signals regulating proliferation of stem and progenitor cells in mouse olfactory epithelium. *Dev Neurosci* 26: 166-180.
3. Murdoch B, Roskams AJ (2007) Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology. *J Mol Histol* 38: 581-599.
4. Costanzo RM (1985) Neural regeneration and functional reconnection following olfactory nerve transection in hamster. *Brain Res* 361: 258-266.
5. Schwob JE, Youngentob SL, Ring G, Iwema CL, Mezza RC (1999) Reinnervation of the rat olfactory bulb after methyl bromide-induced lesion: timing and extent of reinnervation. *J Comp Neurol* 412: 439-457.
6. Bergman U, Ostergren A, Gustafson AL, Brittebo B (2002) Differential effects of olfactory toxicants on olfactory regeneration. *Arch Toxicol* 76: 104-112.
7. Kobayashi M, Costanzo RM (2009) Olfactory nerve recovery following mild and severe injury and the efficacy of dexamethasone treatment. *Chem Senses* 34: 573-580.
8. Buck L, Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175-187.
9. Sullivan SL, Adamson MC, Ressler KJ, Kozak CA, Buck

- LB (1996) The chromosomal distribution of mouse odorant receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 884-888.
10. Mombaerts P (1999) Odorant receptor genes in humans. *Curr Opin Genet Dev* 9: 315-320.
11. Zhang X, Firestein S (2002) The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci* 5: 124-133.
12. Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB (1994) Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79: 1245-1255.
13. Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nunez JM, Vosshall LB, et al. (1994) Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79: 981-991.
14. Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, et al. (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87: 675-686.
15. Potter SM, Zheng C, Koos DS, Feinstein P, Fraser SE, et al. (2001) Structure and emergence of specific olfactory glomeruli in the mouse. *J Neurosci* 21: 9713-9723.
16. Treloar HB, Feinstein P, Mombaerts P, Greer CA (2002) Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *J Neurosci* 22: 2469-2477.
17. Mombaerts P (1996) Targeting olfaction. *Curr Opin Neurobiol* 6: 481-486.
18. Mombaerts P (2001) How smell develops. *Nat Neurosci* 4 Suppl: 1192-1198.
19. Belluscio L, Katz LC (2001) Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. *J Neurosci* 21: 2113-2122.
20. Johnson BA, Xu Z, Ali SS, Leon M (2009) Spatial representations of odorants in olfactory bulbs of rats and mice: similarities and differences in chemotopic organization. *J Comp Neurol* 514: 658-673.
21. Soucy ER, Albeanu DF, Fantana AL, Murthy VN, Meister M (2009) Precision and diversity in an odor map on the olfactory bulb. *Nat Neurosci* 12: 210-220.
22. Zhao H, Ivic L, Otaki JM, Hashimoto M, Mikoshiba K, et al. (1998) Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science* 279: 237-242.
23. Araneda RC, Kini AD, Firestein S (2000) The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nat Neurosci* 3: 1248-1255.
24. Araneda RC, Peterlin Z, Zhang X, Chesler A, Firestein S (2004) A pharmacological profile of the aldehyde receptor repertoire in rat olfactory epithelium. *J Physiol* 555: 743-756.
25. Bozza T, Feinstein P, Zheng C, Mombaerts P (2002) Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *J Neurosci* 22: 3033-3043.
26. Stewart WB, Kauer JS, Shepherd GM (1979) Functional organization of rat olfactory bulb analysed by the 2 deoxyglucose method. *J Comp Neurol* 185: 715-734.
27. Johnson BA, Woo CC, Leon M (1998) Spatial coding of odorant features in the glomerular layer of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 393: 457-471.
28. Rubin BD, Katz LC (1999) Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 23: 499-511.
29. Johnson BA, Leon M (2000) Modular representations of odorants in the glomerular layer of the rat olfactory bulb and the effects of stimulus concentration. *J Comp Neurol* 422: 496-509.
30. Wachowiak M, Cohen LB (2001) Representation of odorants by receptor neuron input to the mouse olfactory bulb. *Neuron* 32: 723-735.
31. Bozza T, McGann JP, Mombaerts P, Wachowiak M (2004) In vivo imaging of neuronal activity by targeted expression of a genetically encoded probe in the mouse. *Neuron* 42: 9-21.
32. Buck LB (1996) Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu Rev Neurosci* 19: 517-544.
33. Mori K, Takahashi YK, Igarashi KM, Yamaguchi M (2006) Maps of odorant molecular features in the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 86: 409-433.
34. Johnson BA, Leon M (2007) Chemotopic odorant coding in a mammalian olfactory system. *J Comp Neurol* 503: 1-34.
35. Christensen MD, Holbrook EH, Costanzo RM, Schwob JE (2001) Rhinotomy is disrupted during the re-innervation of the olfactory bulb that follows transection of the olfactory nerve. *Chem Senses* 26: 359-369.
36. John JA, Key B (2003) Axon mis-targeting in the olfactory bulb during regeneration of olfactory neuroepithelium. *Chem Senses* 28: 773-779.
37. Costanzo RM (2000) Rewiring the olfactory bulb: changes in odor maps following recovery from nerve transection. *Chem Senses* 25: 199-205.
38. Yee KK, Costanzo RM (1998) Changes in odor quality discrimination following recovery from olfactory nerve transection. *Chem Senses* 23: 513-519.
39. Yee KK, Costanzo RM (1995) Restoration of olfactory mediated behavior after olfactory bulb deafferentation. *Physiol Behav* 58: 959-968.
40. Ducray A, Bondier JR, Michel G, Bon K, Millot JL, et al. (2002) Recovery following peripheral destruction of olfactory neurons in young and adult mice. *Eur J Neurosci* 15: 1907-1917.
41. Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, et al. (2007) Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* 450: 503-508.
42. Levine N (2010) Appendix B: Some Notes on the Statistical Comparison of Two Samples. *CrimeStat: A Spatial Statistics Program for the Analysis of Crime Incident Locations*. Houston, TX.
- Available: <http://www.icpsr.umich.edu/CrimeStat/files/CrimStatAppendix.B.pdf>
43. Zheng C, Feinstein P, Bozza T, Rodriguez I, Mombaerts P (2000) Peripheral olfactory projections are differentially affected in mice deficient in a cyclic nucleotide-gated channel subunit. *Neuron* 26: 81-91.
44. Vassalli A, Rothman A, Feinstein P, Zapotocky M, Mombaerts P (2002) Minigenes impart odorant receptor specific axon guidance in the olfactory bulb. *Neuron* 35: 681-696.
45. Iwema CL, Fang H, Kurtz DB, Youngentob SL, Schwob JE (2004) Odorant receptor expression patterns are restored in lesion-recovered rat olfactory epithelium. *J Neurosci* 24: 356-369.
46. Zou DJ, Feinstein P, Rivers AL, Mathews GA, Kim A, et al. (2004) Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Science* 304: 1976-1979.
47. Fleischmann A, Shykind BM, Sosulski DL, Franks KM, Glinka ME, et al. (2008) Mice with a "mono-clonal nose": perturbations in an olfactory map impair odor discrimination. *Neuron* 60: 1068-1081.
48. Stowers L, Logan DW (2010) Olfactory mechanisms of stereotyped behavior: on the scent of specialized circuits. *Curr Opin Neurobiol* 20: 274-280.
49. Burd GD (1993) Morphological study of the effects of intranasal zinc sulfate irrigation on the mouse olfactory epithelium and olfactory bulb. *Microsc Res Tech* 24: 195-213.
50. Schwob JE, Youngentob SL, Mezza RC (1995) Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion. *J Comp Neurol* 359: 15-37.
51. Bergman U, Brittebo EB (1999) Methimazole toxicity in rodents: covalent binding in the olfactory mucosa and detection of glial fibrillary acidic protein in the olfactory bulb. *Toxicol Appl Pharmacol* 155: 190-200.
52. Bergstrom U, Giovanetti A, Piras E, Brittebo EB (2003) Methimazole-induced damage in the olfactory mucosa: effects on ultrastructure and glutathione levels. *Toxicol*

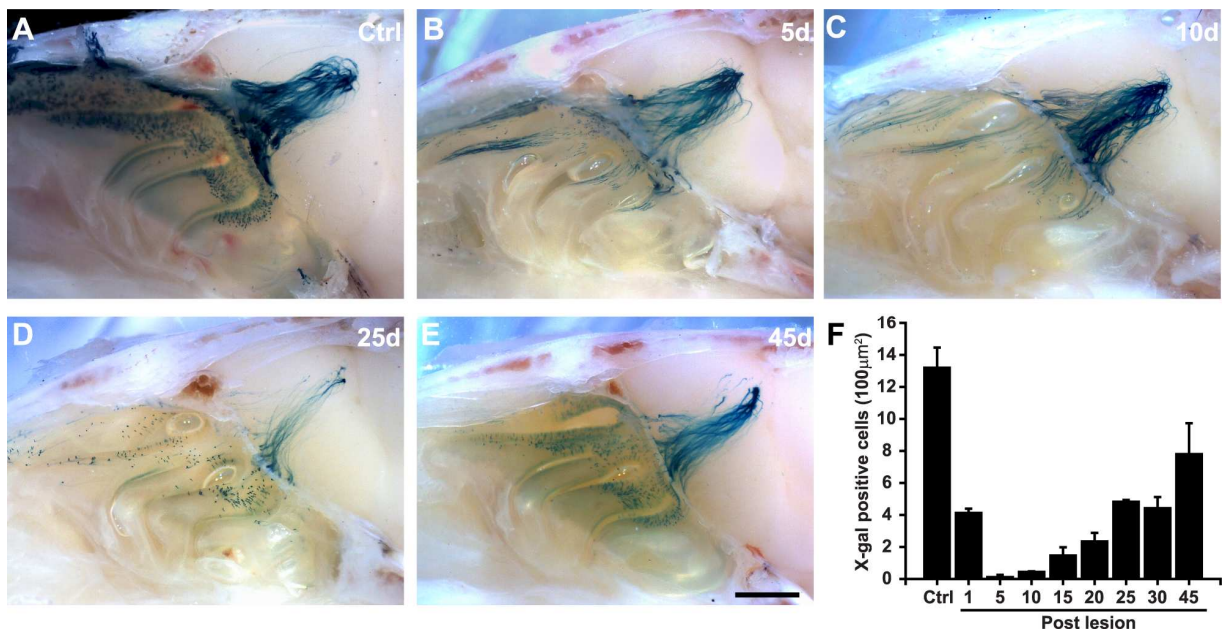
Pathol 31: 379-387.

53. Leung CT, Coulombe PA, Reed RR (2007) Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci* 10: 720-726.
54. Li Y, Field PM, Raisman G (2005) Olfactory ensheathing cells and olfactory nerve fibroblasts maintain continuous open channels for regrowth of olfactory nerve fibres. *Glia* 52: 245-251.
55. Imai T, Yamazaki T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Abe T, et al. (2009) Pre-target axon sorting establishes the neural map topography. *Science* 325: 585-590.
56. Gogos JA, Osborne J, Nemes A, Mendelsohn M, Axel R (2000) Genetic ablation and restoration of the olfactory topographic map. *Cell* 103: 609-620.
57. Schaefer ML, Finger TE, Restrepo D (2001) Variability of position of the P2 glomerulus within a map of the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 436: 351-362.
58. Strotmann J, Conzelmann S, Beck A, Feinstein P, Breer H, et al. (2000) Local permutations in the glomerular array of the mouse olfactory bulb. *J Neurosci* 20: 6927-6938.
59. Slotnick B, Cockerham R, Pickett E (2004) Olfaction in olfactory bulbectomized rats. *J Neurosci* 24: 9195-9200.
60. Xu F, Schaefer M, Kida I, Schafer J, Liu N, et al. (2005)

Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *J Comp Neurol* 489: 491-500.

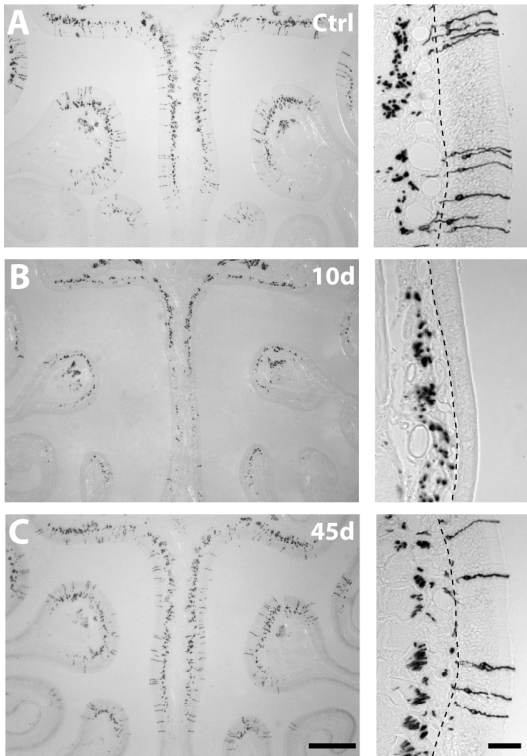
61. Luo M, Katz LC (2001) Response correlation maps of neurons in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 32: 1165-1179.
62. Spors H, Grinvald A (2002) Spatio-temporal dynamics of odor representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 34: 301-315.
63. Munger SD, Leinders-Zufall T, Zufall F (2008) Subsystem Organization of the Mammalian Sense of Smell. *Annu Rev Physiol*.
64. Papes F, Logan DW, Stowers L (2010) The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell* 141: 692-703.
65. Fendt M, Endres T (2008) 2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT), a component of fox odor - just repugnant or really fear-inducing? *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1259-1266.
66. Mandiyan VS, Coats JK, Shah NM (2005) Deficits in sexual and aggressive behaviors in *Cnga2* mutant mice. *Nat Neurosci* 8: 1660-1662.

## Figure Legends

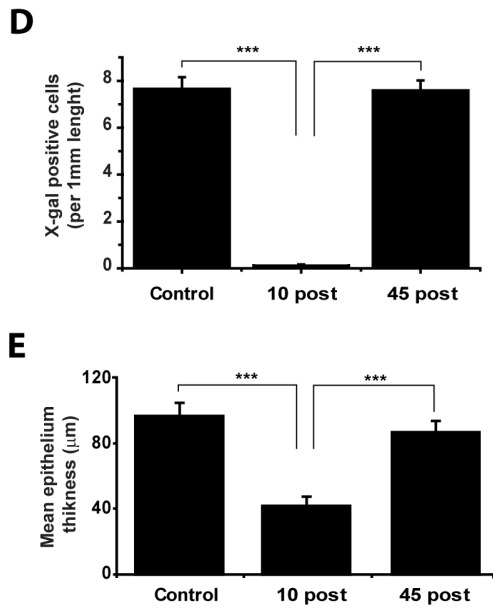


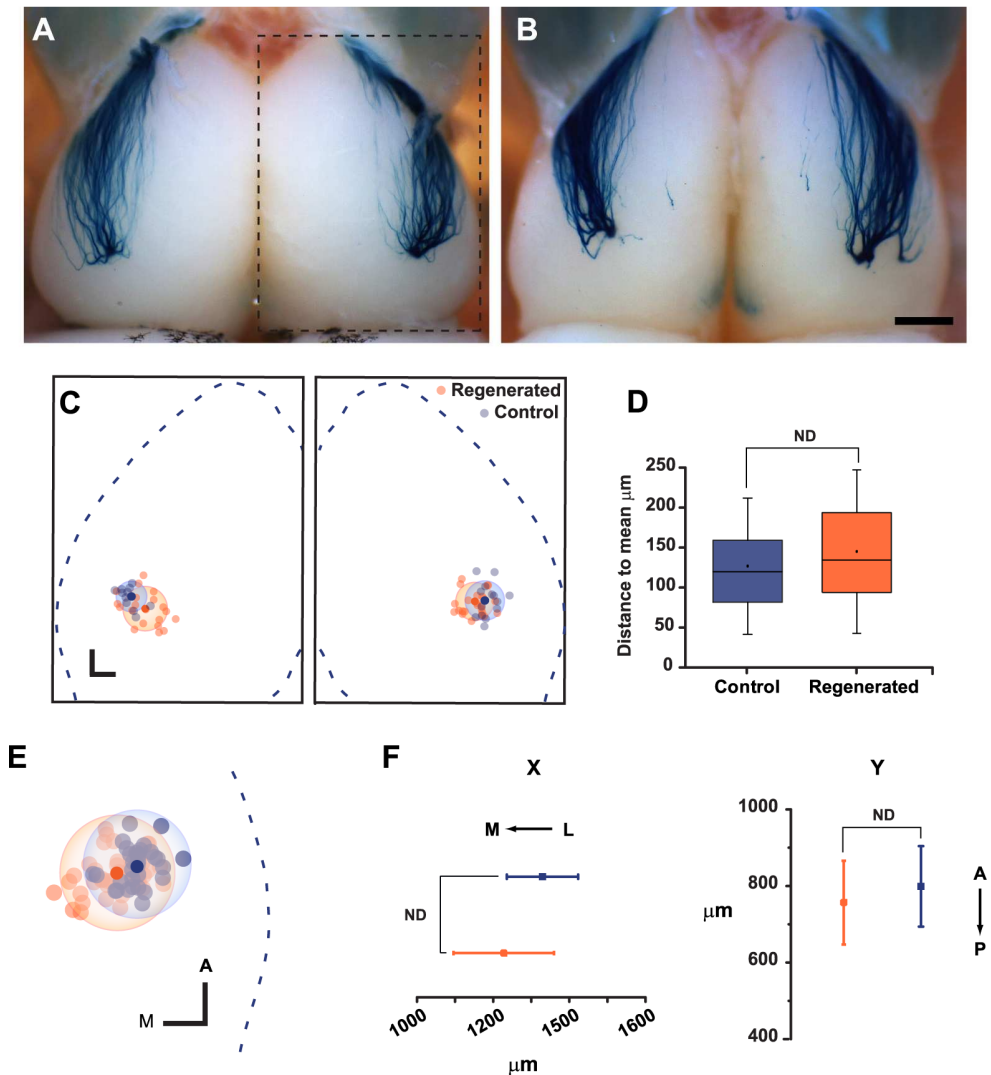
**Figure 1. M72 olfactory circuit is restored following ablation by methimazole administration.** **A**, Medial view of OE and OB is shown. M72 neurons lie at the dorsal portion of the turbinates, their axons innervate the dorsal aspect of OB where they coalesce into glomeruli. **B**, No cell bodies can be observed 5 days post lesion. **C**, Ten days after lesion few M72-positive neurons are observed. X-gal stained axons and glomeruli remained visible on the surface of the bulb. **D**, 25 days post lesion M72-positive neurons could be observed in the turbinates and their axons have re-innervated the OB. **E**, After 45 days, M72-positive cell bodies and glomeruli have regenerated almost completely. The pattern of innervation is similar to control animals even

though some wandering axons remain visible. **F**, Cell counts at the turbinates show the time-course of regeneration of X-gal stained cells. Scale bar 500µm. Mean ± SEM are represented.

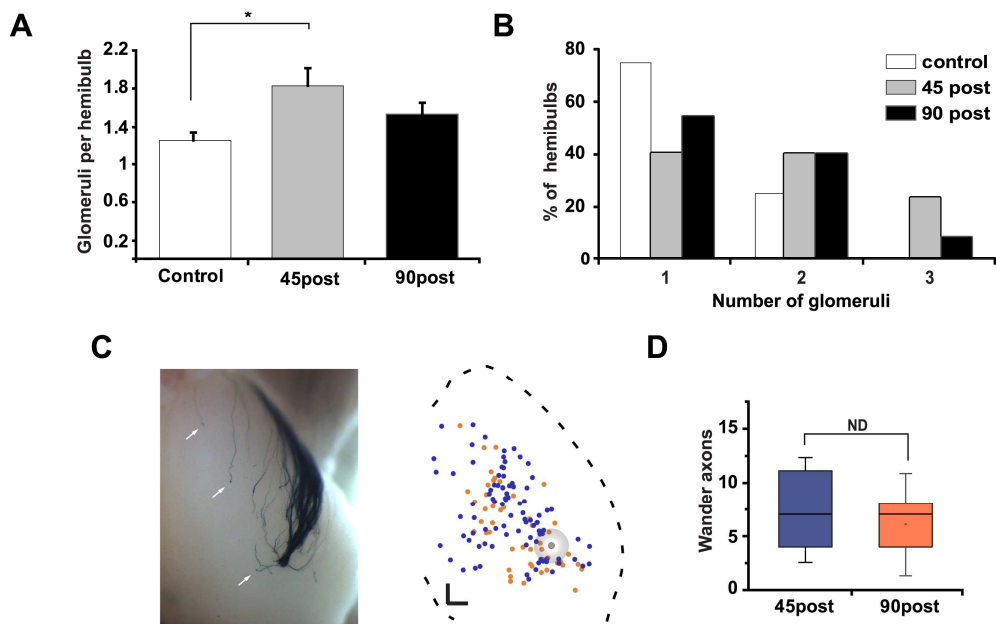


**Figure 2. M72-expressing OSN population is regenerated 45 days after methimazole treatment.** **A**, Coronal view of control olfactory epithelium is shown. At higher magnification X-gal stained neurons can be observed within the OE and axons can also be seen traversing the LP. **B**, Almost no X-gal stained neurons can be observed 10 days post lesion. Some axons bundles remain visible along the LP. **C**, 45 days after methimazole induced lesion, the regenerated olfactory epithelium cannot be distinguished from that of control animals. **D**, Cell counts in the OE show that the population of M72 neurons is regenerated after methimazole treatment. **E**, Thickness of olfactory epithelia is significantly decreased 10 days post lesion. Mean ± SEM. Scale bars 400µm and 80µm in OE magnifications. \*\*\* denotes  $P < 0.05$ .

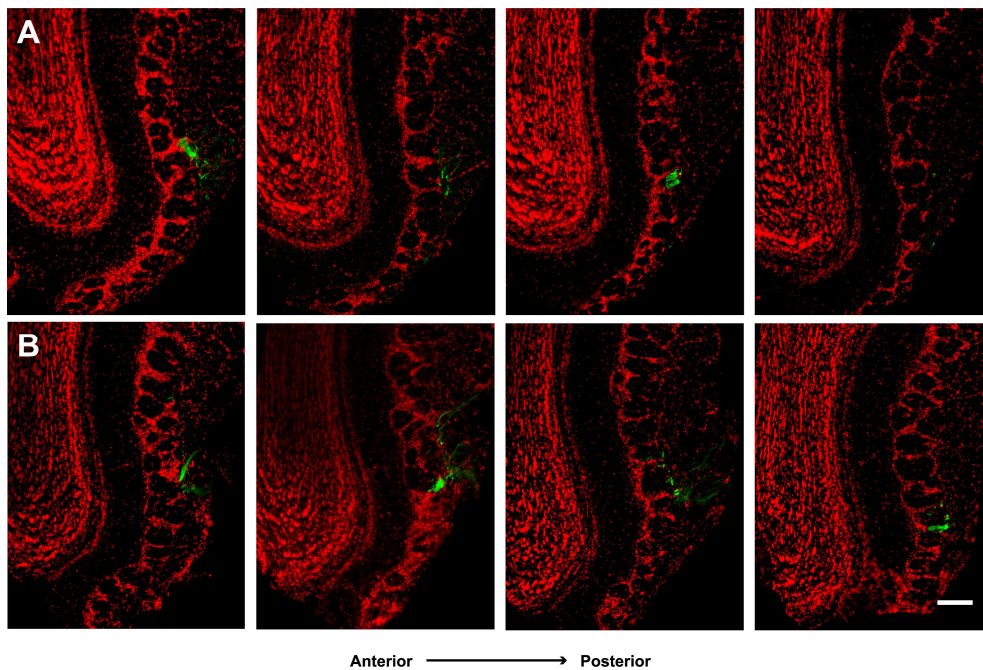




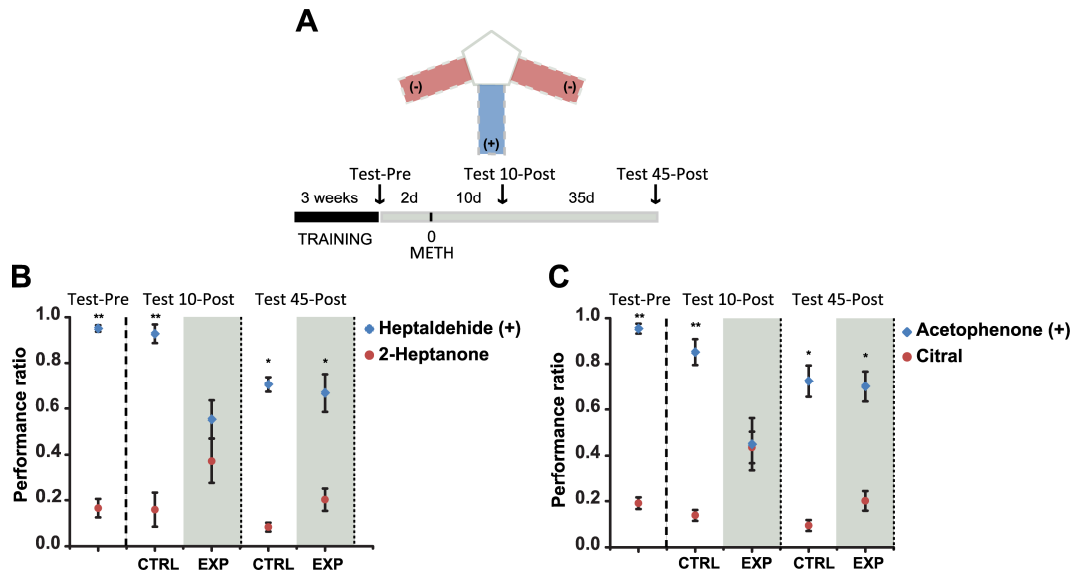
**Figure 3. Position of M72 lateral glomerulus is recovered after regeneration.** **A**, Image of the dorsal aspect of a M72-IRES-tauLacZ control mouse showing the lateral glomeruli on the surface of OB. **B**, Representative image of M72 lateral glomeruli 45 days after methimazole administration. Notice the striking similar pattern of innervation compared to control animals. **C**, Summary of glomerular distribution after regeneration. The normalized dorsal aspect of olfactory bulbs is represented (dashed line in A shows the OB contour taken in every image to perform the normalization), the centroid of all glomeruli in control animals (blue dots) and 45 days post lesion (orange dots). The mean position (filled dots) and 2 standard distances (transparent spheres around the means) are shown. **D**, Box plot of the values of Euclidean distances showing no significant differences between control and regenerated mice. **E**, All glomeruli projected on the right plane at a higher magnification. **F**, The analysis of the mean position carried on the normalized X- and Y-axes shows no significant differences in glomerular location following regeneration. Mean  $\pm$  SD are represented. Scale bars 500 $\mu$ m (C) and 200 $\mu$ m (D, F). Latero-medial (L-M), Antero-posterior (A-P), No difference (ND).



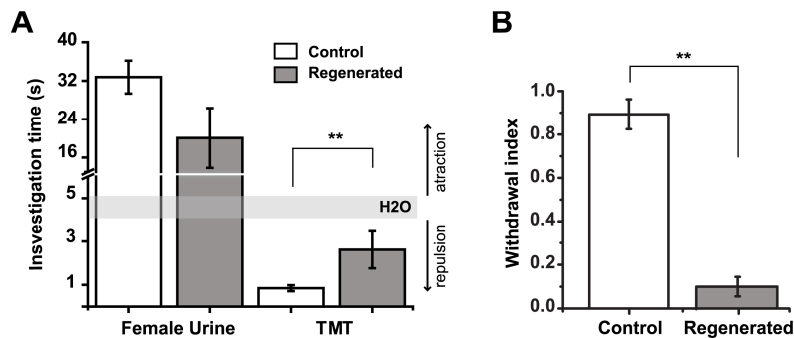
**Figure 4. No refinement of glomerular circuits after regeneration.** **A**, The mean number of lateral glomeruli increased 45 days after methimazole administration (\* denotes  $P < 0.05$ ). No evident refinement of glomeruli is observed 90 days after methimazole exposure ( $P > 0.05$ ). **B**, Percentage of hemibulbs showing the indicated number of glomeruli. **C**, Image of dorsal bulb from regenerated mice (left) and normalized plane with the distribution of miss routed axons at 45 (blue dots) and 90 (orange dots) days post lesion (right). **D**, Box plot of the number of miss routed axons. Mean  $\pm$  SEM are represented. Scale bar 200 $\mu$ m, (ND, no difference).



**Figure 5. I7 glomerular circuit is restored 45 days after methimazole-induced lesion.** Representative images of serial coronal slices of bulbs from I7-IRES-tauGFP mice are shown. **A**, The projection of GFP-positive axons into the antero-ventro-lateral aspect of control OB, it can be observed that they coalesce in one lateral glomerulus (arrow). **B**, 45 days post-lesion the axons project mainly into two adjacent locations (arrows) in the same area shown in A. Insets at the bottom show a close-up of GFP fibers. Space between slices is 40  $\mu\text{m}$ . Scale bar 100 $\mu\text{m}$  and 50 $\mu\text{m}$  for insets.



**Figure 6. Memory of an olfactory discrimination task is recovered after the regeneration.** **A**, Diagram of the three-arm maze and temporal course of the experiments is shown. **B** and **C**, Performance in the discrimination task pre- and post-methimazole administration in group 1 and group 2 respectively. Both groups discriminate the odorants after training (Test-Pre) (\*\* denotes  $P < 0.01$ ). Ten days after methimazole treatment the experimental group (EXP) fails to perform the task ( $P > 0.05$ ), 45 days post lesion, mice recover the ability to perform the task (\* denotes  $P < 0.05$ ). Mean  $\pm$  SEM are represented.



**Figure 7. Odorant-clued innate behavior is partially recovered after regeneration.** **A**, Histogram shows the investigation time for female urine and TMT. Behavioral responses to attractive female urine from regenerated males cannot be distinguished from control animals 45 days after OE ablation ( $P > 0.05$ ). However, responses to the repulsive odorant



TMT are significantly different between control and regenerated animals. The latter showing significant increases in investigation time of TMT-scented filter paper and **B**, decreased withdrawal responses to this pheromone 45 days after ablation. (\*\* denotes  $P < 0.01$ ). Mean  $\pm$  SEM are represented.