



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**PAPEL DE LA ACTIVIDAD SENSORIAL EN EL
DESARROLLO DEL CIRCUITO GLOMERULAR DE
BULBO OLFATORIO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

PABLO VALLE LEIJA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROMÁN VIDAL TAMAYO RAMÍREZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTORAL:

DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. DAVID GARCÍA DÍAZ

FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO D.F., NOVIEMBRE 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

1. RESUMEN	7
2. ABSTRACT	8
3. INTRODUCCION	9
3.1. Modelos de desarrollo de circuitos neuronales modulares en la etapa postnatal: Nativismo, seleccionismo y constructivismo	9
3.2. Circuito modular glomerular	11
3.2.1. Organización del circuito glomerular y receptores a odorantes.....	11
3.2.2. Modelos de desarrollo del circuito glomerular	14
3.2.3. Relación de la actividad sensorial y espontánea con los modelos de desarrollo en circuitos glomerulares específicos	17
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
5. HIPÓTESIS	22
6. MODELO DE ESTUDIO	23
7. OBJETIVOS	25
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
9. MATERIALES Y MÉTODOS	27
9.1. Animales	27
9.2. Exposición Crónica a Odorantes (ECO).....	27
9.3. Análisis de los glomérulos I7	27
9.4. Análisis de los glomérulos M72.....	28
9.5. Análisis estadístico	29
10. RESULTADOS	30
10.1. El número de repeticiones glomerulares se mantuvo constante en un ambiente olfatorio control	30
10.2. La exposición crónica a odorantes (ECO) produce la formación de pequeños glomérulos supernumerarios.....	30
10.3. Formación de glomérulos supernumerarios por ECO dependió de la concentración del odorante	33
10.4. Glomérulos supernumerarios permanecieron y aumentaron su volumen después de la interrupción de la ECO	34
10.5. Formación de glomérulos supernumerarios por ECO ocurrió durante un periodo sensible del desarrollo	36

10.6. Reorganización local de las aferentes primarias glomerulares durante la ECO.....	37
11. DISCUSIÓN.....	40
12. RECOPIACIÓN Y CONCLUSIONES	43
13. RELEVANCIA Y PERSPECTIVAS	44
14. REFERENCIAS.....	45
15. ARTÍCULO PUBLICADO	50

DEDICATORIA

Esta tesis de doctorado se la dedico a las siguientes personas:

A mis padres Eduardo y Martha Cristina.

A mis hermanos: Eduardo, Ana Paola e Ivan.

A mis amigos y familiares: Rodrigo García, Paz Leija, José García, Paula García, Manuel Leija, Verónica Leija, Didier Boremanse, Manuel Salcedo, Fernando Bermúdez, Adolfo García, Alejandro Guzmán, Diana Vargas, Tere Vergara, Rosalba Martínez, Josafat Torres, Elías Reyes, Ingrid Cubides, Jorge Luis Mendoza, Amanda Villalón, Mario Riquelme, Raquel Martínez, Anna Burns, Leonardo Estrada, Francisco Poullard; finalmente y de manera muy especial a Ivonne Freige.

A mis compañeros de la generación LIBB.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible de forma directa o indirecta la realización de esta tesis de doctorado.

Al doctor Gabriel Gutiérrez Ospina por haber señalado el rumbo correcto del proyecto de doctorado, y por sus brillantes observaciones constantes durante el desarrollo del proyecto. Y por toda la extraordinaria influencia que ha tenido sobre mi formación académica.

Al doctor René Drucker Colín porque me aceptó de manera muy amable en su laboratorio y con apoyo total sobre el proyecto de doctorado.

Al doctor Román Vidal Tamayo Ramírez por haberme aceptado como su estudiante y porque sin él no me hubiera encontrado con este fabuloso modelo de estudio que es el circuito glomerular de ratón. También por darme mucha libertad sobre la planeación de los experimentos del proyecto y por orientarme en el momento en que lo requería, dinámica que fue en extremo beneficiosa para mi formación.

A Eduardo Blanco Hernández por el tiempo que invertimos juntos en largas pláticas sobre el sistema olfatorio de ratón, tiempo más beneficioso que una clase o seminario.

A Diana Millán Aldaco, Marcela Palomero Rivero, y el resto de los miembros del laboratorio del Dr. René Drucker Colín por su gran ayuda y por haber convivido con ellos durante los años del doctorado.

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM por el apoyo académico obtenido durante la realización de los estudios de doctorado.

A Don Lino Aguilar Ortíz ya que sin su servicio el laboratorio no funcionaría en absoluto.

RECONOCIMIENTO

Todos los experimentos de esta tesis de doctorado fueron realizados en el laboratorio del Dr. René Drucker Colín en el Instituto de Fisiología Celular. El desarrollo de este proyecto de investigación fue apoyado por los donativos de CONACyT (56295) y UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN224407) del Dr. Román Vidal Tamayo Ramírez. Fue fundamental para la realización de la tesis y del proyecto de investigación la beca de doctorado por parte del CONACyT obtenida por Pablo Valle Leija a partir de febrero del 2008.

1. RESUMEN

La actividad sensorial participa en el refinamiento de los circuitos neuronales durante el desarrollo postnatal temprano. Sin embargo, su papel en la formación de los circuitos no es claro, ya que se piensa que es la actividad neuronal espontánea y los factores genéticos los principales promotores de este proceso. Gracias al descubrimiento de la familia de genes de los receptores a odorantes, es posible estudiar de manera más precisa si la experiencia olfatoria tiene algún efecto sobre la formación de los circuitos glomerulares en el bulbo olfatorio. En este trabajo evaluamos el efecto de la exposición crónica a odorantes (ECO) sobre la formación y el desarrollo del circuito glomerular. Para realizarlo se utilizaron ratones “*knock-in*” modificados de manera genética que expresan los genes reporteros proteína verde fluorescente (GFP) y LacZ acoplados a la expresión de los receptores a odorantes I7 y M72, respectivamente. Con el objetivo de estimular de manera crónica y específica el sistema olfatorio, se expuso a los ratones a heptaldehído y acetofenona, ligandos odorantes específicos de los receptores I7 y M72, respectivamente. Nuestros resultados mostraron que la ECO conlleva a la formación permanente de glomérulos supernumerarios I7 y M72 de forma dependiente de la dosis. La generación de nuevos glomérulos ocurre sólo temprano en el desarrollo y proponemos que es dependiente de la reorganización de las fibras del glomérulo previamente formado, y no de la ausencia de refinamiento de las proyecciones. Por lo tanto, nuestros resultados refuerzan la idea que la formación de glomérulos olfatorios a lo largo del desarrollo postnatal sigue reglas constructivistas, y documentan que la experiencia sensorial juega un papel central en el proceso de formación de los glomérulos, y no sólo refinamiento tardío.

2. ABSTRACT

It is accepted that sensory experience instructs the remodelling of neuronal circuits during postnatal development, after their specification has occurred. The story is less clear with regard to the role of experience during the initial formation of neuronal circuits, whether prenatal or postnatal, since this process is now supposed to be primarily influenced by genetic determinants and spontaneous neuronal activity. Here, we evaluated this last issue by examining the effect that postnatal chronic exposure to cognate odorants has on the formation of I7 and M72 glomeruli, iterated olfactory circuits that are formed before and after birth, respectively. We took advantage of double knock-in mice whose I7 and M72 primary afferents express green fluorescent protein or β -galactosidase, correspondingly. Our results revealed that postnatal odorant chronic exposure lead to the formation of permanent supernumerary I7 or M72 glomeruli in a dose and time dependent manner. The emergence of the new glomeruli seemed to occur at the expense of the reorganization of the primary afferents of a previously formed glomerulus and not as the consequence of preventing glomeruli elimination. Hence, overall our results support that sensory experience indeed instructs the permanent formation of specific glomeruli in the mouse olfactory bulb by means of constructivist processes.

3. INTRODUCCIÓN

Los genes influyen en la ontogenia cerebral de forma precisa; sin embargo, la ontogenia del cerebro no sólo involucra una serie de pasos en apariencia determinados por los genes, sino que la experiencia sensorial influye en gran medida en la etapa postnatal a través de un proceso epigenético que se ha denominado plasticidad neuronal. Los mecanismos básicos que subyacen a este proceso de ajuste incluyen la formación y eliminación de sinapsis, la continua producción de nuevas neuronas en algunas regiones del cerebro, la reorganización de las conexiones neuronales de manera dependiente de la actividad neuronal y la eliminación selectiva de las neuronas a través de mecanismos de competencia, entre otros (Fox *et al.*, 2010).

Uno de los mejores ejemplos de la función de la experiencia sensorial en el cerebro en desarrollo es el trabajo de Hubel y Wiesel en la corteza visual del gato. Ellos encontraron que la privación sensorial monocular crónica durante el desarrollo postnatal temprano disminuye de manera dramática el tamaño de las columnas de dominancia ocular correspondientes al ojo privado, mientras que aquéllas correspondientes al ojo no privado aumentan de tamaño, demostrando así que la competencia por los blancos post-sinápticos depende de manera primordial de la actividad sensorial visual (Hubel y Wiesel, 1970; Schmidt *et al.*, 2002).

3.1. MODELOS DE DESARROLLO DE CIRCUITOS NEURONALES MODULARES EN LA ETAPA POSTNATAL: NATIVISMO, SELECCIONISMO Y CONSTRUCTIVISMO

Un tipo de circuito neuronal muy usado para el estudio del desarrollo del cerebro es el circuito modular, debido a la facilidad con que los módulos se pueden identificar anatómica y funcionalmente y a que son circuitos repetidos. Los estudios pioneros de Mountcastle, y de Hubel y Wiesel, hicieron énfasis en la organización modular, funcional y anatómica, en diversas regiones del cerebro de mamífero. Desde entonces se ha hecho un esfuerzo para estudiar el desarrollo de los circuitos modulares en el cerebro. De manera general se han propuesto 3 modelos diferentes (Purves, 1994; FIGURA 1): En el primer modelo llamado NATIVISTA, los módulos parecen estar preespecificados, habiendo un número definido que se presenta desde el propio origen de la estructura, y con el tiempo crecen de forma escalar pero no aumentan ni disminuyen en número; este modelo puede explicar el desarrollo de muchas estructuras en insectos (Laissue *et al.*, 1999). Sin embargo, en el transcurso de la evolución y aumento de la complejidad estructural, particularmente en la rama de los vertebrados, se ha postulado que existen otros dos tipos de estrategias que los cerebros pueden seguir para formar sus circuitos en la etapa postnatal. En el modelo más aceptado, el SELECCIONISTA, se propone que al momento del nacimiento o en edades tempranas del desarrollo existe un número alto de módulos y, conforme el animal se desarrolla, muchos de esos módulos se pierden de manera dirigida por el ambiente o por

procesos de plasticidad, lo que en teoría permite al animal tener una adaptación óptima de su conducta y de su estructura cerebral al ambiente en el que se encuentra. Por otra parte, hay algunas áreas del cerebro en mamíferos, en particular el bulbo olfatorio (Pomeroy *et al.*, 1990), que no parecen seguir el mecanismo seleccionista sino que la regla es empezar con pocos módulos e ir adicionando conforme avanza el tiempo y el animal se desarrolla. A este modelo se le conoce como CONSTRUCTIVISTA, y en él no hay pérdida de módulos, pues la mayor parte de ellos se generan conforme transcurre el desarrollo postnatal en función de las necesidades del organismo.

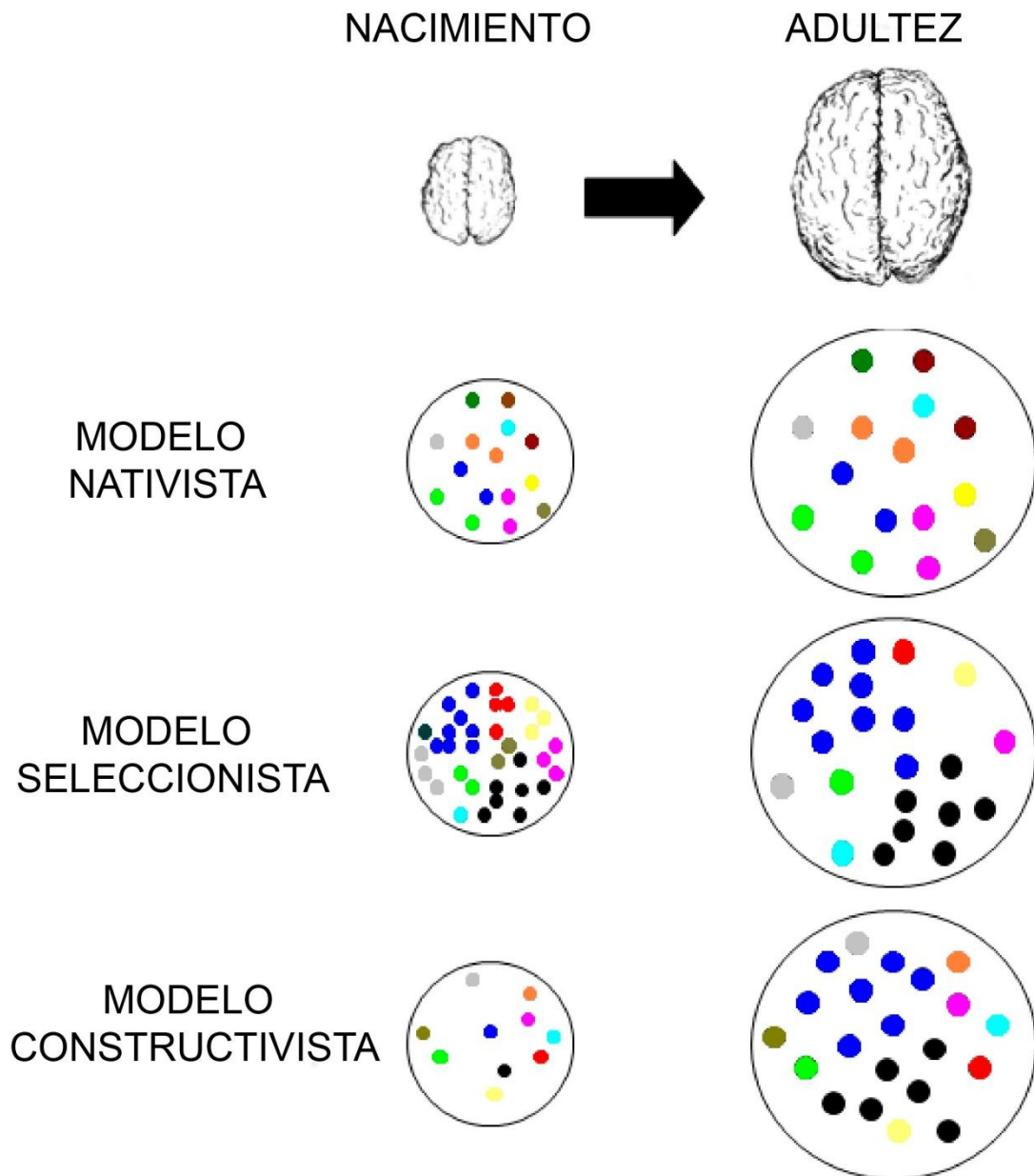


FIGURA 1: Modelos de desarrollo de circuitos modulares durante la etapa postnatal. En el modelo nativista en un inicio se forman todos los circuitos preespecificados requeridos, sin haber cambios o plasticidad. En el modelo seleccionista se forma un exceso de

circuitos que, dependiendo del uso, van desapareciendo. En el modelo constructivista hay un número bajo de circuitos generados al nacimiento y con el tiempo se incorporan más, según los requerimientos del organismo. Modificado de Purves, 1994.

3.2. CIRCUITO MODULAR GLOMERULAR

El bulbo olfatorio es una estructura que ha sido estudiada en forma amplia en el contexto del desarrollo postnatal, debido principalmente a que su organización laminar separa las funciones del procesamiento de la información olfatoria de manera muy clara. En esta organización laminar en su zona más superficial se encuentra la capa donde el circuito glomerular se estructura. En el bulbo olfatorio se ha estudiado la formación de los distintos grupos neuronales y el conjunto de circuitos asociado a las distintas láminas durante el desarrollo postnatal temprano (Lledo *et al.*, 2008; Adam y Mizrahi, 2010), pero en mayor medida se ha estudiado cómo se forman los glomérulos (Pomeroy *et al.*, 1990; Meisami y Sendera, 1993; Valverde *et al.*, 1992; Potter *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2004). Los glomérulos son estructuras modulares en forma de esfera con propiedades anatómico-funcionales definidas por las neuronas sensoriales olfatorias y sus receptores a odorantes (Potter *et al.*, 2001; Wachowiak *et al.*, 2004), localizados en el epitelio olfatorio. El modelo de desarrollo del circuito glomerular es ideal en cuanto a la estrategia de formación por la simplicidad de su conjunto de circuitos.

3.2.1. ORGANIZACIÓN DEL CIRCUITO GLOMERULAR Y RECEPTORES A ODORANTES

La estructura encargada de detectar los olores es el epitelio olfatorio. Es aquí donde se encuentran las neuronas sensoriales que se encargan de detectar los odorantes a través de receptores específicos que se encuentran en su membrana (Huard *et al.*, 1998). Las neuronas sensoriales olfatorias son neuronas bipolares. Su segmento apical extiende sólo una dendrita hacia la superficie del epitelio, donde da origen a cilios cuya membrana contiene cientos de receptores a odorantes.

En el segmento basal de la neurona emerge el axón que atraviesa la placa cribiforme y alcanza al bulbo olfatorio (Morrison y Constanzo, 1990). Los axones de las neuronas sensoriales olfatorias establecen sinapsis con neuronas de relevo, mitrales y empenachadas, que a su vez envían la información a diversas regiones del sistema nervioso central.

En el bulbo olfatorio la sinapsis entre las neuronas sensoriales y las de relevo está confinada a los glomérulos olfatorios (FIGURA 2). Existen aproximadamente 2000 glomérulos por bulbo olfatorio en el ratón (Mombaerts, 2006). La interacción de las neuronas sensoriales olfatorias y las neuronas de relevo es modulada por numerosas interneuronas conocidas como periglomerulares (Chen y Shepherd, 2005). Cada axón de cada neurona olfatoria hace sinapsis únicamente en un glomérulo y cada dendrita apical de cada neurona de relevo tiene confinado su árbol dendrítico en un sólo glomérulo (FIGURA 2). En cada glomérulo los axones de miles de neuronas olfatorias hacen sinapsis con aproximadamente 20-50 neuronas de relevo (Chen y Shepherd, 2005).

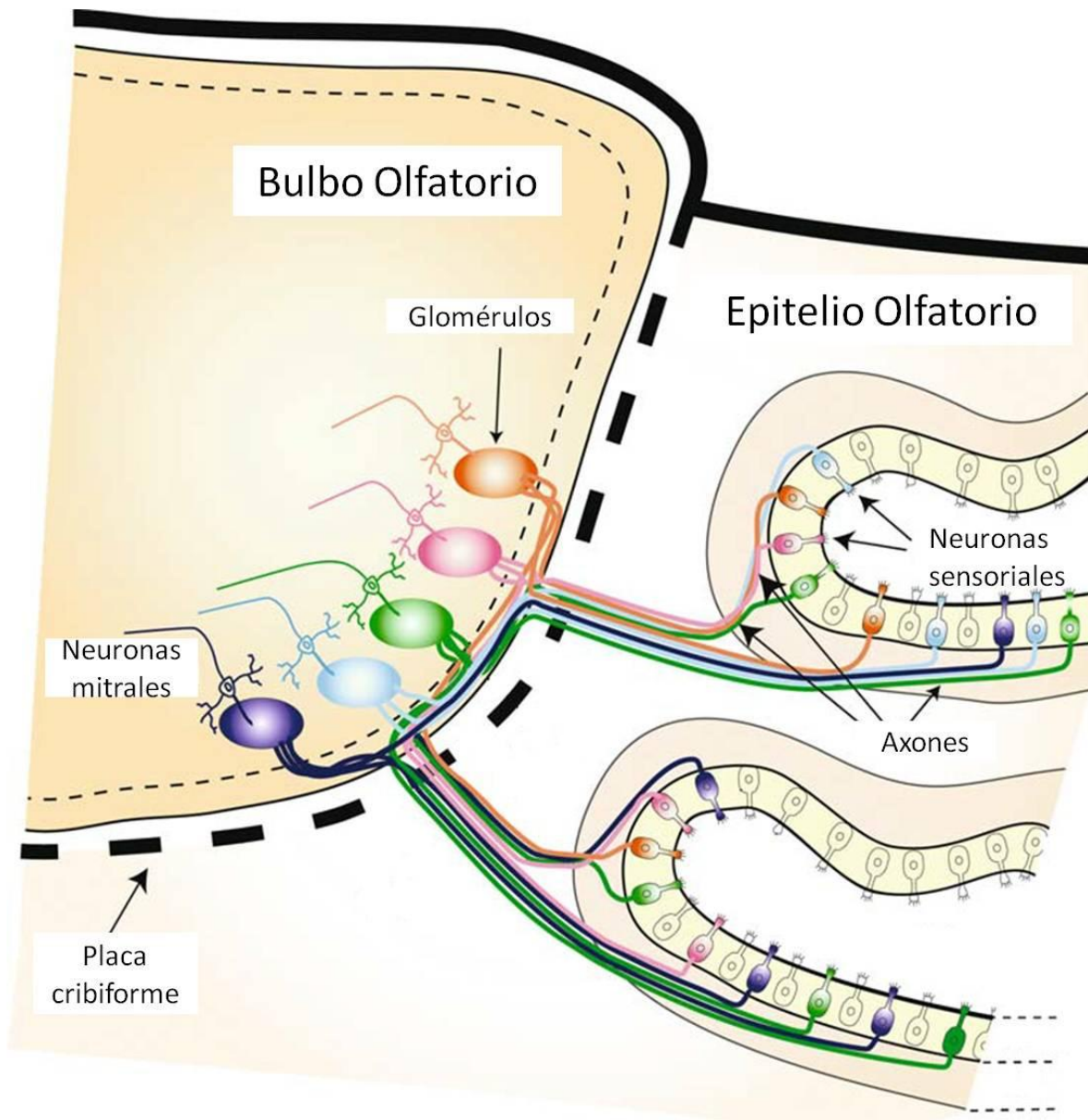


FIGURA 2: Organización del sistema olfatorio. Las neuronas sensoriales olfatorias localizadas en el epitelio olfatorio son activadas por moléculas odorantes. Estas neuronas proyectan sus axones al bulbo olfatorio, los cuales atraviesan la placa cribiforme y hacen contacto con neuronas mitrales de relevo en estructuras con forma semiesférica conocidas como glomérulos. Modificado de Nedelec et al., 2005.

Los receptores a odorantes son generados gracias a la existencia de una familia multigénica diversa, formada por más de 1000 genes en la rata y el ratón (Mombaerts, 2006). La diversidad de estos receptores permite la discriminación de una gran variedad de odorantes de diferente tamaño, tipo y grupo químico. Esta familia de receptores tienen en común que transducen sus señales a través de proteínas G heterotriméricas que unen GTP. Al igual que otros receptores acoplados a proteínas G, éstos poseen, por una parte, regiones hidrofóbicas que sirven como dominios transmembranales, y regiones hidrofílicas de "pocket" que unen al ligando extracelularmente. Este "pocket" está formado por la

combinación de secuencias presentes en las distintas regiones transmembranales. De manera interesante la secuencia de aminoácidos en esta región es muy variable entre los distintos receptores, lo cual provee un mecanismo para el reconocimiento de una gran variedad de moléculas odorantes (Pilpel y Lancet, 1999).

Un paso crucial en la transmisión de la información olfatoria es la unión del odorante con su receptor específico, fenómeno que produce la activación de la proteína G-olfatoria, el aumento en la actividad de la enzima adenilato ciclasa y el consecuente incremento en la producción de AMPc. Con posterioridad se activa un canal catiónico acoplado a nucleótidos cíclicos, que causa la despolarización de la neurona y finalmente la generación de potenciales de acción que se transmiten hacia el bulbo olfatorio (Jones y Reed, 1989).

Las neuronas sensoriales olfatorias que expresan el mismo tipo de receptor a odorante proyectan sus axones desde el epitelio olfatorio y convergen en glomérulos específicos en el bulbo olfatorio (Feinstein y Mombaerts, 2004; FIGURA 3). En general, hay al menos un glomérulo correspondiente a cada receptor a odorante por hemibulbo (lateral y medial), cuya posición es estereotípica entre individuos (Mombaerts, 2006; FIGURA 3), por lo tanto hay al menos 4 repeticiones glomerulares correspondientes a cada receptor a odorantes por individuo (FIGURA 3). Esto tiene la importancia de determinar el campo receptivo a los distintos odorantes, tanto en la propia neurona como en el glomérulo (Araneda *et al.*, 2000), debido a que cada receptor tiene un ligando odorante preferente que lo activa (Bozza *et al.*, 2002; Kerr y Belluscio, 2006; Nguyen *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2010; Todrank *et al.*, 2011). Los glomérulos carecen de somas celulares y constan principalmente de neuropilo y de procesos astrocíticos. Los glomérulos tienen una densidad muy alta de sinapsis y su ensamblaje y refinamiento durante el desarrollo parece depender tanto de la expresión de los receptores a odorantes como de la actividad neuronal (Bozza *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2004; Imai *et al.*, 2006; Kerr y Belluscio, 2006; Serizawa *et al.*, 2006; Biju *et al.*, 2008; Maher *et al.*, 2009; Mobley *et al.*, 2010).

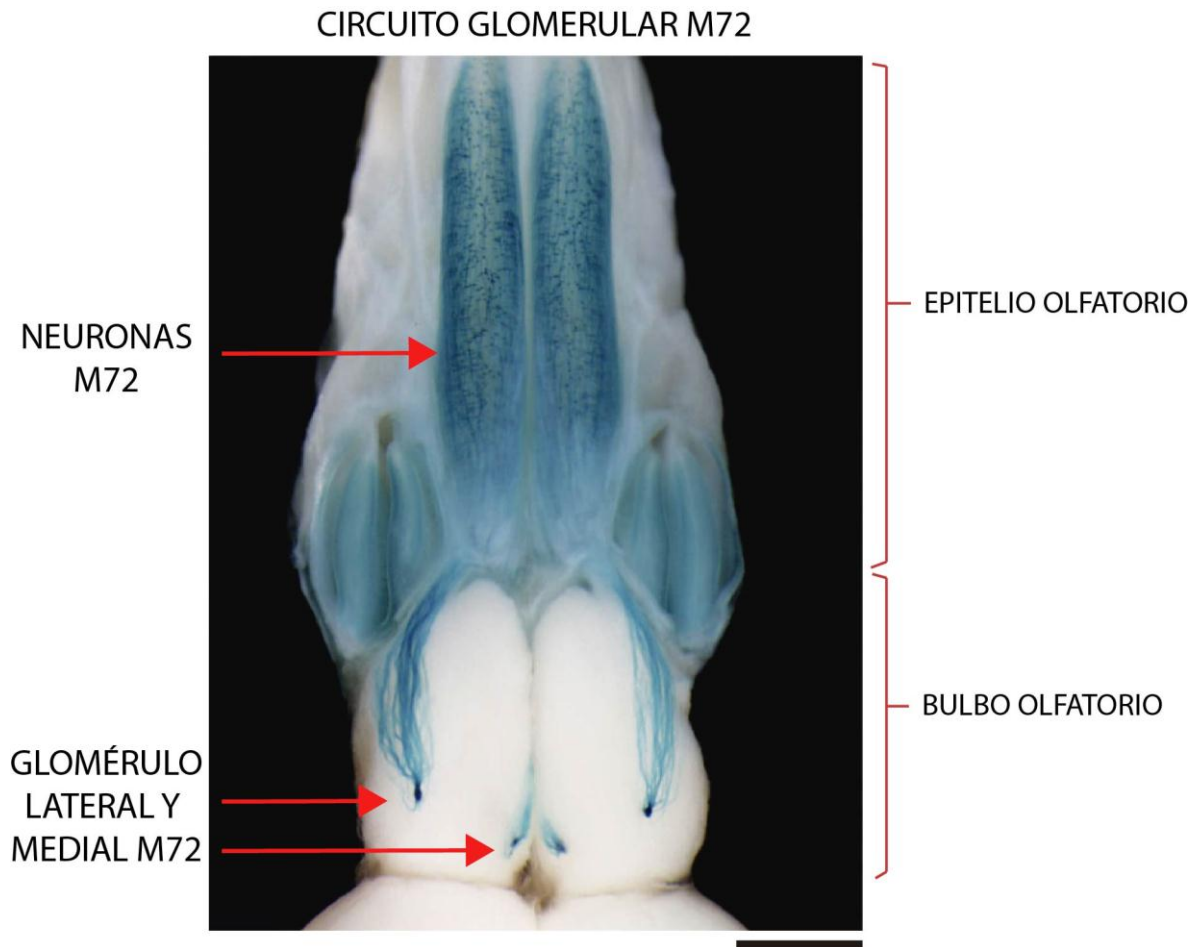


FIGURA 3: Las neuronas sensoriales olfatorias que expresan un mismo tipo de receptor a odorante proyectan sus axones a glomérulos con coordenadas específicas en el bulbo olfatorio. La imagen muestra el bulbo olfatorio y epitelio olfatorio de un ratón M72tLacZ, en el cual pueden apreciarse las neuronas y los axones positivos a β -galactosidasa. Las neuronas M72 se encuentran dispersas en el epitelio olfatorio. Éstas proyectan sus axones hacia un sólo glomérulo por hemibulbo (lateral y medial). En general, se forma al menos un glomérulo por hemibulbo correspondiente a cada receptor a odorante. Escala = 1mm. *Figura tomada de Biju et al., 2008.*

3.2.2. MODELOS DE DESARROLLO DEL CIRCUITO GLOMERULAR

Los glomérulos, siendo circuitos modulares, parecen seguir un modelo nativista de desarrollo, ya que la posición y los componentes de los circuitos parecen estar determinados genéticamente (Mombaerts *et al.*, 1996). Sin embargo, posterior a su formación inicial, en la etapa postnatal temprana, suceden diversos fenómenos plásticos. En uno de los estudios realizados en ratón se propuso que al nacimiento existe un bajo número de glomérulos y, conforme el ratón se desarrolla hasta la adultez, hay un aumento considerable en el número de glomérulos de hasta 5 veces (Pomeroy *et al.*, 1990; FIGURA 4A). Sin embargo hay reportes en rata que difieren al proponer que el número glomérulos se mantiene prácticamente constante a partir del nacimiento (Meisami y Sendera, 1993; FIGURA 4B). De manera adicional en otro reporte en ratón, se propone que el número de

repeticiones de circuitos glomerulares específicos tiende a disminuir (Zou *et al.*, 2004; FIGURA 4C). Las diferencias podrían estar relacionadas con discrepancias técnicas (FIGURA 4). En realidad, en los primeros dos estudios mencionados se utilizó una aproximación global de conteo, de manera independiente del tipo de circuito glomerular. En cambio, en el tercer estudio se hizo el conteo en circuitos glomerulares específicos, y se analizó el número de repeticiones M71 y M72.

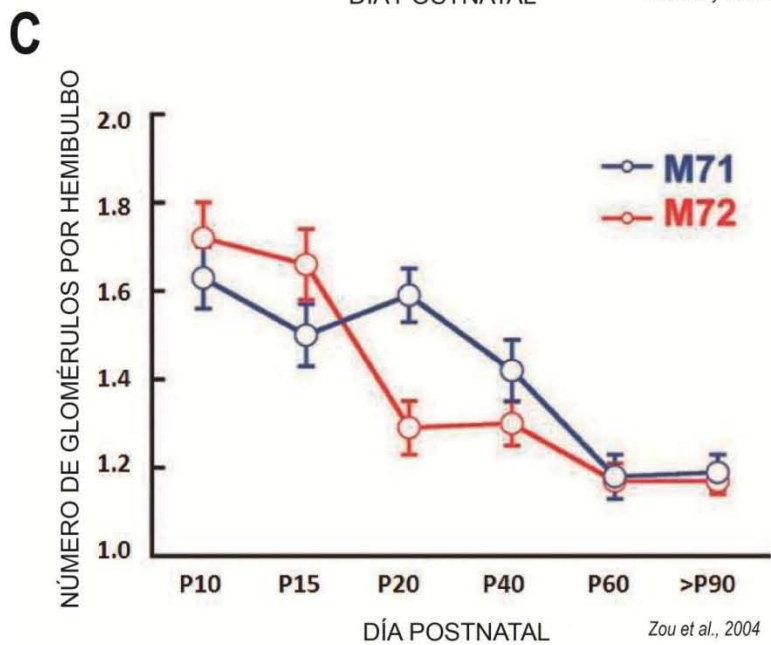
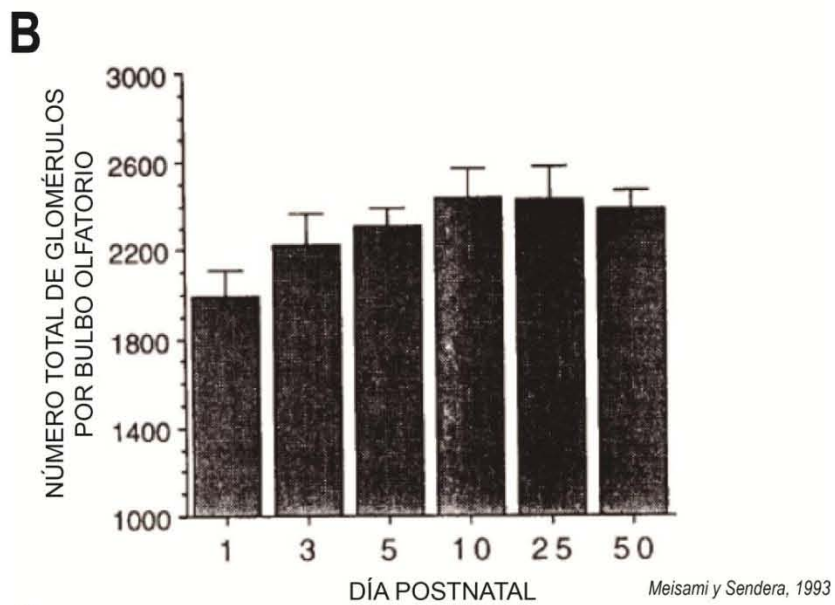
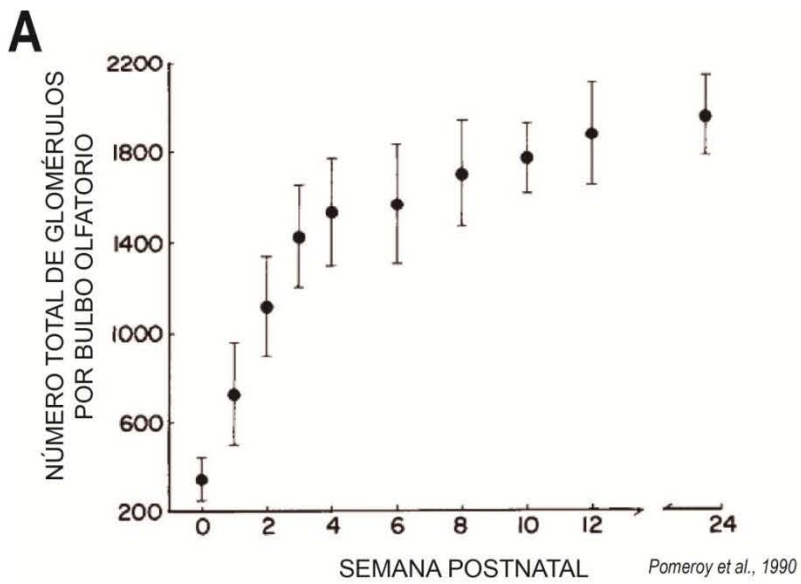


FIGURA 4: Tres evidencias que sustentan cada uno de los tres modelos de desarrollo en el circuito glomerular. El primer estudio (A), apoya el modelo constructivista, utilizando la técnica de Nissl (marca somas); se propuso que el número de glomérulos aumenta considerablemente durante el desarrollo de ratón (Pomeroy *et al.*, 1990). El segundo estudio (B), apoya el modelo nativista, utilizando la técnica de citocromo oxidasa (marca neuropilo); se propuso que el número de glomérulos permanece prácticamente constante durante el desarrollo de rata (Meisami y Sendera, 1993). El tercer estudio (C), apoya el modelo seleccionista, utilizando circuitos glomerulares marcados; se propuso que el número de repeticiones de los glomérulos específicos M71 y M72 disminuye durante el desarrollo de ratón (Zou *et al.*, 2004).

3.2.3. RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD SENSORIAL Y ESPONTÁNEA CON LOS MODELOS DE DESARROLLO EN CIRCUITOS GLOMERULARES ESPECÍFICOS

La formación de los circuitos glomerulares tiene dos características fundamentales: Posicionamiento de las fibras y formación glomerular inicial, y número de repeticiones de glomérulos. La primera tiene que ver con la proyección de los axones de las neuronas sensoriales al bulbo olfatorio y su coalescencia o convergencia en un lugar específico para formar el glomérulo (FIGURA 3), lo cual está determinado de forma genética y por actividad espontánea (Yu *et al.*, 2004). La segunda característica consiste en el número de repeticiones locales que se forman de un circuito glomerular en particular, lo cual puede variar de acuerdo a la experiencia sensorial olfatoria. Esta propiedad de iteratividad o repetición de los circuitos neuronales es muy común en distintas regiones del cerebro donde las características anatómico-funcionales se repiten en varios módulos o neuronas (Purves *et al.*, 1992), tal como sucede para el circuito glomerular (FIGURA 3).

El modelo nativista está representado por la primer característica mencionada. Se sabe que al impedir que una población de neuronas sensoriales olfatorias tenga actividad eléctrica espontánea, no se forma el glomérulo correspondiente (Yu *et al.*, 2004; FIGURA 5B); sin embargo, en ausencia de experiencia olfatoria, los glomérulos se pueden formar sin problema; esto se ha visto en ratones *knock-out* del canal CNG, que es el efector de las respuestas olfatorias (Lin *et al.*, 2000; FIGURA 5D), y en el modelo de privación unilateral olfatoria (Zou *et al.*, 2004).

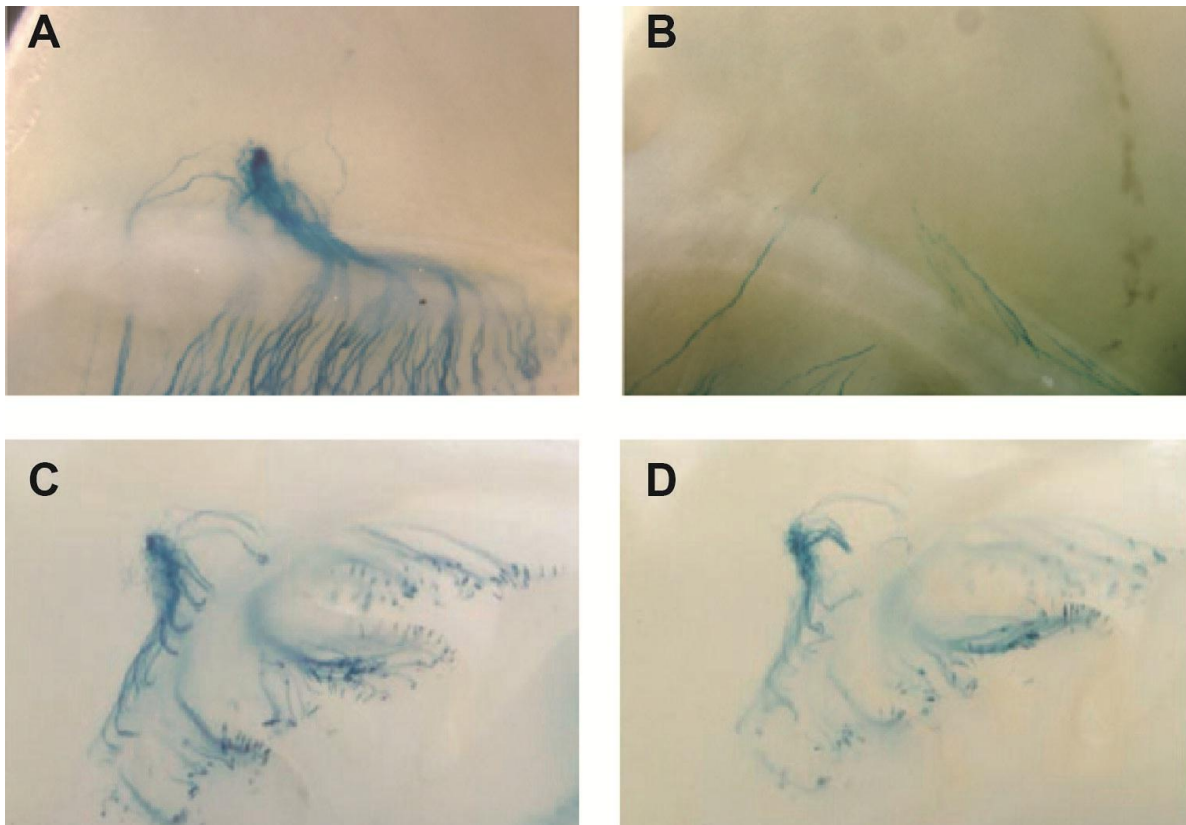


FIGURA 5: La actividad espontánea es instructiva en la formación inicial del circuito glomerular, no así la actividad sensorial. El bloqueo del disparo espontáneo a través de la sobreexpresión del canal Kir 2.1 en la población P2 impide la formación del glomérulo correspondiente (B), en comparación con la formación normal en un ratón *wild type* (A) (Yu *et al.*, 2004). En un ratón *knock-out* del canal CNG en el que no hay respuestas olfatorias inducidas por odorantes, la formación del glomérulo P2 se da de forma similar (D) a un ratón *wild type* (C) (Lin *et al.*, 2000).

Los modelos constructivista y seleccionista se relacionan a la variación en el número de repeticiones de los glomérulos específicos (disminución o aumento). Como ya se mencionó, el número de repeticiones mínimas que tiene un circuito glomerular específico es cuatro, cada una correspondiente a cada hemibulbo (FIGURA 3). En algunos casos el número de repeticiones para un circuito glomerular específico puede variar de manera espontánea, sin embargo, se ha propuesto que este proceso está determinado por la experiencia olfatoria, que puede modificar esto a la alza o a la baja. Hay tres evidencias principales que apoyan esta teoría: 1) Se ha reportado diferente número de repeticiones de glomérulos P2 y M72 en distintos laboratorios (Mombaerts *et al.*, 1996; Royal y Key, 1999; Zheng *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Schaefer *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2004; Biju *et al.*, 2008), lo cual puede explicarse por las diferencias existentes en los ambientes olfatorios (Oliva *et al.*, 2010). 2) La exposición a octanal de forma condicionada durante el desarrollo postnatal disminuye el número de glomérulos I7 en comparación con los ratones no expuestos (Kerr y Belluscio, 2006; FIGURA 6A). 3) Se ha reportado que el tipo de caja en la cual los ratones son criados

en los bioterios provoca una diferencia en el número de repeticiones del glomérulo P2: la explicación radica en que varía la ventilación ambiental, y debido a que el glomérulo P2 es activado por compuestos presentes en la orina; a menor ventilación más concentrados están estos compuestos y se origina mayor número de glomérulos P2 (Oliva *et al.*, 2010; FIGURA 6B).

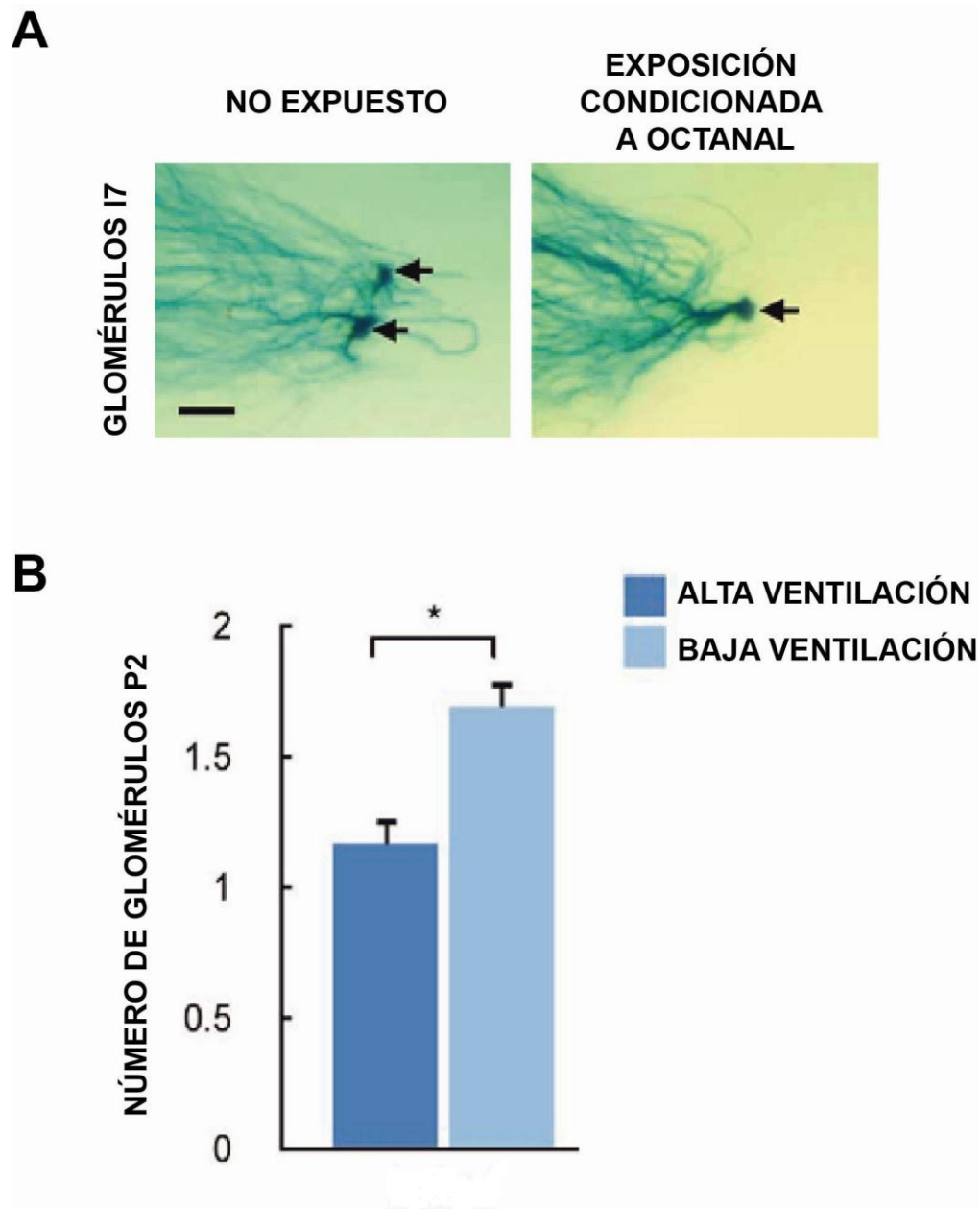


FIGURA 6: Dos evidencias sobre el efecto de la experiencia sensorial en relación con el número de repeticiones de glomérulos específicos. La exposición condicionada a octanal disminuye el número de repeticiones del glomérulo I7 durante el desarrollo postnatal (2 glomérulos I7) en comparación con la condición control (1 glomérulo I7) (A) (Kerr y Belluscio, 2006). Escala = 100µm. Dos tipos de ambiente olfatorio, con baja y alta

ventilación, tienen un impacto sobre el número promedio de repeticiones del glomérulo P2 durante el desarrollo postnatal (B) (Oliva *et al.*, 2010).

Ninguna de las evidencias mencionadas en el párrafo anterior sustentan necesariamente una predominancia constructivista o seleccionista en el efecto de la experiencia olfatoria, puesto que no se puede afirmar que el número de repeticiones finales fue resultado del refinamiento o de la construcción de nuevos glomérulos. Un ejemplo hipotético que ilustra esto: Si el resultado final son 3 glomérulos, si fuera un proceso seleccionista el que participa, la proyección inicial antes de la formación sería a 4 o más sitios y finalmente la estructuración de sólo 3 glomérulos; o también podrían formarse 4 glomérulos y ocurrir la posterior eliminación de uno (Zou *et al.*, 2004). Por otra parte, si fuera un proceso constructivista el que participa, la proyección inicial sería a un sitio donde se formaría un glomérulo, y posteriormente las fibras llegarían al sitio 2 y 3 para definir los 3 glomérulos finales (Pomeroy *et al.*, 1990).

En este estudio nos interesó entender un poco más el proceso de iteratividad o repetición de circuitos, la relación con los modelos de desarrollo, en especial el modelo constructivista y seleccionista, y cómo puede influir la experiencia olfatoria utilizando un protocolo de estimulación que no se ha utilizado aún para estudiar el desarrollo glomerular, que es la exposición crónica a odorantes (ECO), la cual simula las condiciones en las que las crías de ratón se desarrollan durante la lactancia, en el ambiente olfatorio crónico que existe en las madrigueras con odorantes específicos dependiendo del hábitat (FIGURA 7).



FIGURA 7: Crías de ratón de campo en su madriguera.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen 3 modelos de desarrollo que podrían explicar la formación y consolidación de los glomérulos olfatorios hacia la adultez: Constructivismo (aumento número de glomérulos), seleccionismo (disminución número de glomérulos) y nativismo (número de glomérulos constante). Para algunos circuitos glomerulares específicos se ha reportado seleccionismo o refinamiento glomerular en condiciones olfatorias control durante la etapa postnatal temprana (Zou *et al.*, 2004; FIGURA 5C), un proceso que es modificado por exposición condicionada a ligandos odorantes específicos (Kerr y Belluscio, 2006). En cambio la consolidación constructivista y nativista de glomérulos olfatorios se ha reportado únicamente con una aproximación global de conteo (Pomeroy *et al.*, 1990; Meisami y Sendera, 1993; FIGURA 5A y 5B).

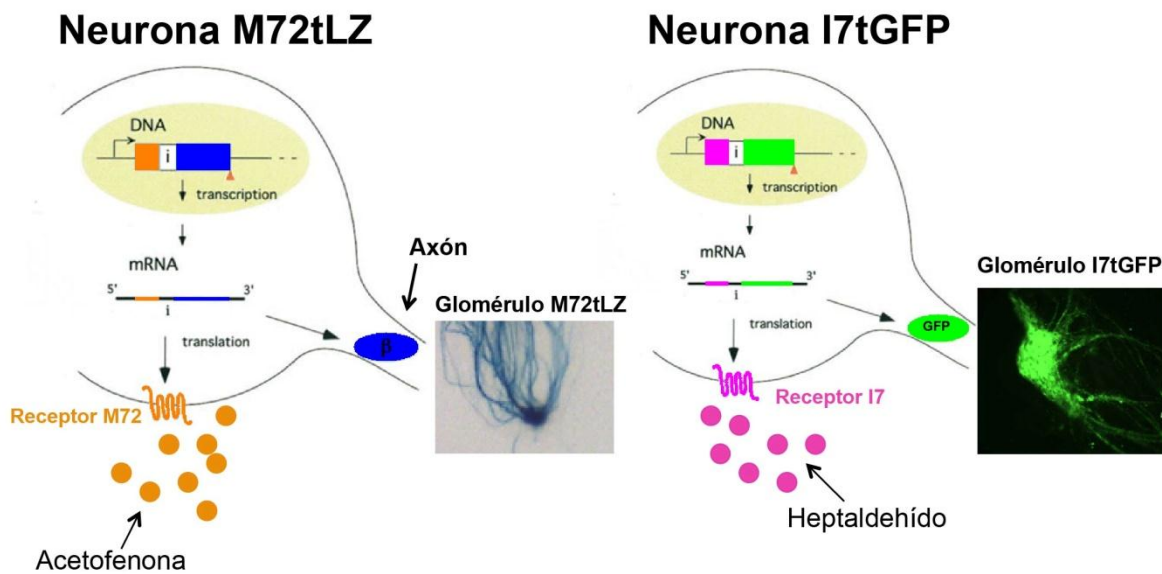
No se conoce el efecto de la exposición crónica a odorantes (ECO) sobre el circuito glomerular y más aún, a qué modelo de desarrollo se ajustaría este tipo de estimulación sensorial.

5. HIPÓTESIS

La exposición crónica a odorantes (ECO) influirá en el proceso de formación de circuitos glomerulares específicos en el bulbo olfatorio a través de un proceso constructivista en la etapa postnatal temprana.

6. MODELO DE ESTUDIO

Existe un modelo genético en ratón (Mombaerts *et al.*, 1996) que brinda la ventaja de poder ver la aferente primaria hacia la zona glomerular, dirigidas a glomérulos específicos (FIGURA 3); por tanto, si el número de repeticiones de glomérulos varía, es muy evidente poder notarlo. Utilizamos una línea de ratones con dos tipos de modificaciones genéticas. En la primer modificación río abajo de la secuencia endógena del receptor a odorantes M72 se tiene una secuencia de ADN llamada IRES (internal ribosome entry site) y la secuencia del gen reportero tLacZ que codifica para la enzima β -galactosidasa, la secuencia IRES permite que el gen del receptor a odorantes y el gen tLacZ se transcriban como uno solo, y se traduzcan como proteínas independientes (Mombaerts *et al.*, 1996). En la segunda modificación río abajo del gen del receptor a odorantes I7 se tiene la secuencia IRES y el gen reportero tGFP (proteína verde fluorescente). Las proteínas reporteras de ambos ratones tienen dominios tau de unión a citoesqueleto, debido a ello es posible ver la aferente primaria hacia los glomérulos de cada circuito (FIGURA 8). Los odorantes ligandos preferentes de los receptores I7 y M72 son heptaldehído y acetofenona, respectivamente (Bozza *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2010), De esta manera es posible estudiar el desarrollo de ambos circuitos en presencia del ligando odorante agonista (FIGURA 8).



Modificado de Potter *et al.*, 2001, J Neurosci.

FIGURA 8: En este esquema se representa la estimulación olfatoria específica para los circuitos M72tLacZ / I7tGFP, por medio de odorantes agonistas de los receptores. En el lado izquierdo se muestra como la acetofenona ligando específico del receptor M72 podría modificar la actividad eléctrica de las neuronas e influir el desarrollo del

glomérulo M72 de manera directa. En el lado derecho se muestra el mismo caso, pero con el receptor I7 y su ligando específico heptaldehído. *Modificado de Potter et al., 2001.*

7. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Investigar la estrategia de desarrollo postnatal (constructivista o seleccionista) que siguen los circuitos glomerulares en presencia de su ligando odorante específico de manera crónica.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar el número de repeticiones de los glomérulos durante la etapa postnatal temprana en un ambiente olfatorio control.
2. Analizar si la exposición crónica a odorantes (ECO) hace variar el número de repeticiones de los glomérulos específicos durante la etapa postnatal temprana.
3. Analizar el volumen de los glomérulos específicos después de la ECO.
4. Analizar si hay diferencia en el número repeticiones de los glomérulos, variando la concentración del odorante utilizada en la exposición crónica.
5. Analizar si los cambios en el número de repeticiones de los glomérulos son permanentes o si hay refinamiento.
6. Analizar si la ECO durante la etapa adulta produce el mismo efecto que en la etapa postnatal temprana (periodo sensible).
7. Con base en el efecto de la ECO establecer qué estrategia de desarrollo se utiliza para la formación de glomérulos.

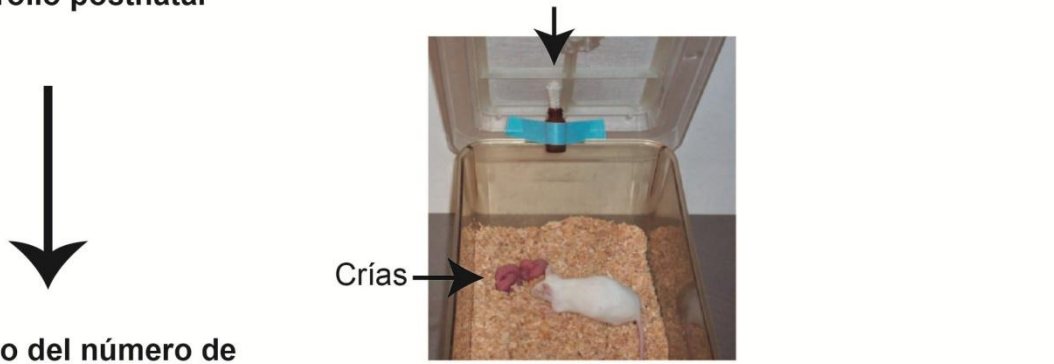
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Debido a que nuestro objetivo principal es dilucidar la estrategia general de desarrollo del circuito glomerular en presencia del ligando odorante específico, nuestros experimentos se enfocan en exponer a los ratones M72tLacZ / I7tGFP postnatal y crónicamente a los odorantes acetofenona y heptaldehído agonistas de los receptores M72 e I7.

Obtener línea de ratones modificados genéticamente I7tGFP / M72tLacZ

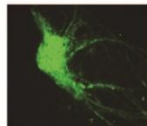


Exposición crónica a odorantes durante desarrollo postnatal



Conteo del número de glomérulos y cuantificación de volumen para cada circuito

Expresión de GFP en tejido fresco



Revelar actividad de β -galactosidasa



9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. ANIMALES

Se utilizaron ratones *Knock-in* de las líneas I7-IRES-tauGFP y M72-IRES-tau-lacZ de distintas edades (especificado en cada experimento). Ambas líneas de ratones donadas por el Dr. Peter Mombaerts (Instituto Max Planck) fueron cruzadas entre si para obtener una línea doble marcada I7tGFP / M72tLacZ. Los ratones fueron mantenidos en un ciclo luz-oscuridad (12/12 horas), teniendo agua y alimento *ad libitum*. Los procedimientos siguieron los estándares de cuidado de animales para experimentos biomédicos de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y los Institutos Nacionales de Salud (NIH en EUA, número de aprobación A5281-01). Todos los experimentos se realizaron con crías de la misma camada y se utilizaron al menos dos camadas por grupo experimental. Se tomaron las medidas necesarias para reducir al mínimo el número de ratones utilizados, así como para aminorar su sufrimiento potencial.

9.2. EXPOSICIÓN CRÓNICA A ODORANTES (ECO)

Ratones I7tGFP / M72tLacZ positivos fueron expuestos a heptaldehído (95% Sigma) o acetofenona (98% J.T. Baker), ligandos agonistas de los receptores a odorantes I7 y M72, respectivamente (Bozza *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2010). Los animales experimentales se mantuvieron en jaulas especiales para ratón, cerradas con una tapa cubierta por un filtro de algodón y una botella que contenía el odorante, acoplada a la tapa. La botella con el odorante se cambió diariamente para mantener constante la concentración. En un primer grupo el heptaldehído se utilizó a una concentración de 10% y la acetofenona de manera pura, debido a que el heptaldehído tiene una presión de vapor 10 veces mayor a la acetofenona (Heptaldehído: 3.85 mm / Hg; Acetofenona: 0.44 mm /Hg a 25°C), además se analizó el efecto, para ambos circuitos, del odorante agonista y no agonista. Se expuso a un grupo de ratones desde el día P0, justo después del nacimiento, hasta el día P20 (98% vol/vol). Posteriormente, se expuso a diferentes grupos de ratones a heptaldehído desde el día P0 al día P20 (0.1, 1 y 10% vol/vol); del día P0 al día P5 (0.1, 1 y 10% vol/vol); del día P10 a P15 (0.1% vol/vol); del día P50 a P70 (10% vol/vol), y del día P5 a P10 a P20 (10% vol/vol). La mitad de los ratones expuestos a heptaldehído 10% del día P0 al día P20 fueron inmediatamente sacrificados, mientras que la otra mitad se mantuvo sin el odorante 30 días más. El heptaldehído se diluyó en DMSO (J.T. Baker) para mantener una adecuada solubilidad. Los grupos expuestos a heptaldehído ó acetofenona y los no expuestos se colocaron en cuartos diferentes en un vivario de ventilación en circuito cerrado para evitar efectos cruzados entre los grupos.

9.3. ANÁLISIS DE LOS GLOMÉRULOS I7

Los ratones fueron sacrificados por decapitación y los bulbos olfatorios fueron disecados. Éstos fueron colocados por separado en una laminilla, y comprimidos con un cubreobjetos hasta obtener un ancho del tejido de $110 \pm 20\mu\text{m}$ con el objetivo de mejorar la resolución de las imágenes. Los glomérulos fueron identificados con la iluminación de epifluorescencia por una lámpara de tungsteno y un microscopio vertical LEICA DM6000 vertical. Las

imágenes fueron obtenidas mediante el uso del *software* LAS AF, utilizando los objetivos 20x y 40x. Las imágenes fueron obtenidas hasta 2 horas después del sacrificio, sin aparente degeneración de las estructuras o la disminución de la intensidad de la marca. Sólo se consideraron glomérulos sin axones truncados para el análisis. El parámetro para considerar las estructuras I7tGFP positivas como glomérulos fue que tuvieran un volumen de al menos $1000\mu\text{m}^3$ con los axones íntegros. La medición del volumen glomerular fue realizada con la herramienta Volumest del programa Image J (Merzin, 2008). Las imágenes usadas para la reconstrucción del volumen glomerular se tomaron cada micra de grosor, por lo tanto el volumen se obtuvo multiplicando el área glomerular de cada imagen x $1\mu\text{m}$, y luego se hizo la suma de las imágenes.

De manera adicional se realizó una inmunofluorescencia para visualizar los glomérulos en el contexto celular del bulbo olfatorio. Para esto los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico y perfundidos transcárdialmente con PBS, seguido de una solución de paraformaldehído al 4%. Después de un periodo de postfijación de 3 horas, los cerebros fueron crioprotegidos con un buffer de sacarosa al 30%, por 2 días a 4°C. Se obtuvo rebanadas (20 micras) con un criostato y se montaron en laminillas. Posteriormente las rebanadas fueron lavadas con PBS 0.1M e incubadas con solución de bloqueo de suero normal de caballo al 10% y tritón al 0.3% por 1 hora. Para marcar las estructuras I7tGFP positivas, las rebanadas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal de cabra anti-GFP (aBCAM, CAT. NO. AB6673) a una concentración de 1:1000 en solución de bloqueo por 24 horas a 4°C. Posteriormente, éstas se lavaron y fueron incubadas por 2 horas con el anticuerpo secundario de burro anti cabra-Alexa 555 (Invitrogen) y contrateñidas con DAPI. Las rebanadas se montaron en cubreobjetos usando medio de montaje acuoso (DAKO). Los glomérulos fueron identificados con la iluminación de epifluorescencia por una lámpara de tungsteno y un microscopio vertical LEICA DM6000 vertical. Las imágenes se obtuvieron mediante el uso del *software* LAS AF utilizando un objetivo 20x y utilizadas con fines únicamente de representación.

9.4. ANÁLISIS DE LOS GLOMÉRULOS M72

Los glomérulos M72tLacZ positivos fueron revelados con la tinción de X-gal en preparaciones completas (Zou et al., 2004). Los ratones se anestesiaron mediante pentobarbital sódico y perfundidos con PBS seguido de paraformaldehído al 4%. Posteriormente los bulbos olfatorios se disecaron e incubaron durante 5 horas en una solución de revelado con lo siguiente: fosfato de sodio 100mM (pH 7.4), 2mM MgCl_2 , 0,01% de desoxicolato de sodio, 0,02% Nonidet P40, 5mM de ferrocianuro de potasio, 5mM de ferricianuro de potasio y 1mg / ml de X-gal. Posteriormente, el tejido se lavó 10 minutos en PBS (pH 7.4). Las imágenes de los glomérulos M72tLacZ positivos fueron tomadas con un microscopio estereoscópico Leica EZ4D y digitalizadas mediante el *software* LEICA FireCam. El parámetro para considerar las estructuras glomerulares M72tLacZ positivas fue que al menos 5 fibras visibles o un haz de fibras que coalescen en una estructura con forma glomerular, debido a que no es posible cuantificar el volumen en este tipo de preparación.

9.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las pruebas estadísticas se realizaron en el programa GraphPad Prism 5. Los datos cuantitativos se presentaron como promedios \pm error estándar. El análisis estadístico se realizó teniendo en cuenta cada hemibulbo de manera independiente en todos los ratones (Zou et al., 2004; Kerr y Belluscio, 2006; Oliva *et al.*, 2010), ya que la probabilidad de encontrar "n" número de glomérulos por hemibulbo en el mismo ratón es igual a la probabilidad de encontrar "n" número de glomérulos en los hemibulbos de distintos ratones. Cada figura muestra la prueba estadística usada y la "n" utilizada. Los análisis se realizaron sin sesgo por parte de un mismo observador.

10.RESULTADOS

10.1. EL NÚMERO DE REPETICIONES GLOMERULARES SE MANTUVO CONSTANTE EN UN AMBIENTE OLFATORIO CONTROL

Con el propósito de examinar si en realidad hay una tendencia a que el número de glomérulos aumente (Pomeroy *et al.*, 1990) o disminuya (Zou *et al.*, 2004) en un ambiente olfatorio control, se contó el número de glomérulos M72 e I7 en ratones control. Se encontró que en los ratones no expuestos a odorantes, el número promedio de repeticiones glomerulares por hemibulbo permaneció constante (FIGURA 9).

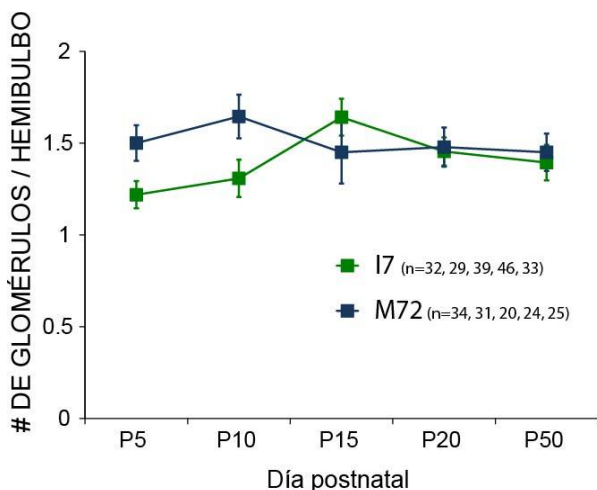


FIGURA 9: No hay cambio en el número de los glomérulos I7 y M72 durante el desarrollo postnatal en un ambiente olfatorio control. La figura muestra el curso temporal del número promedio de glomérulos I7 y M72 por hemibulbo a lo largo del desarrollo postnatal, no existe diferencia significativa en ninguno de los puntos. Kruskal-Wallis $P > 0.05$.

10.2. LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A ODORANTES (ECO) CAUSÓ LA FORMACIÓN DE PEQUEÑOS GLOMÉRULOS SUPERNUMERARIOS

Con el objetivo de examinar el efecto de la ECO sobre el circuito glomerular se expusó a los ratones a heptaldehído y acetofenona, ligandos naturales agonistas de los receptores a odorantes I7 y M72, respectivamente (Bozza *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2010), durante los primeros 20 días de vida. Los ratones expuestos mostraron un aumento en el número promedio de glomérulos por hemibulbo. Dicho aumento fue específico, ya que el heptaldehído provocó el aumento sólo de glomérulos I7 y acetofenona de glomérulos M72 (FIGURA 10). En ambos casos la distribución espacial de los glomérulos fue de menos de 700 μm de distancia unos de otros (FIGURA 10).

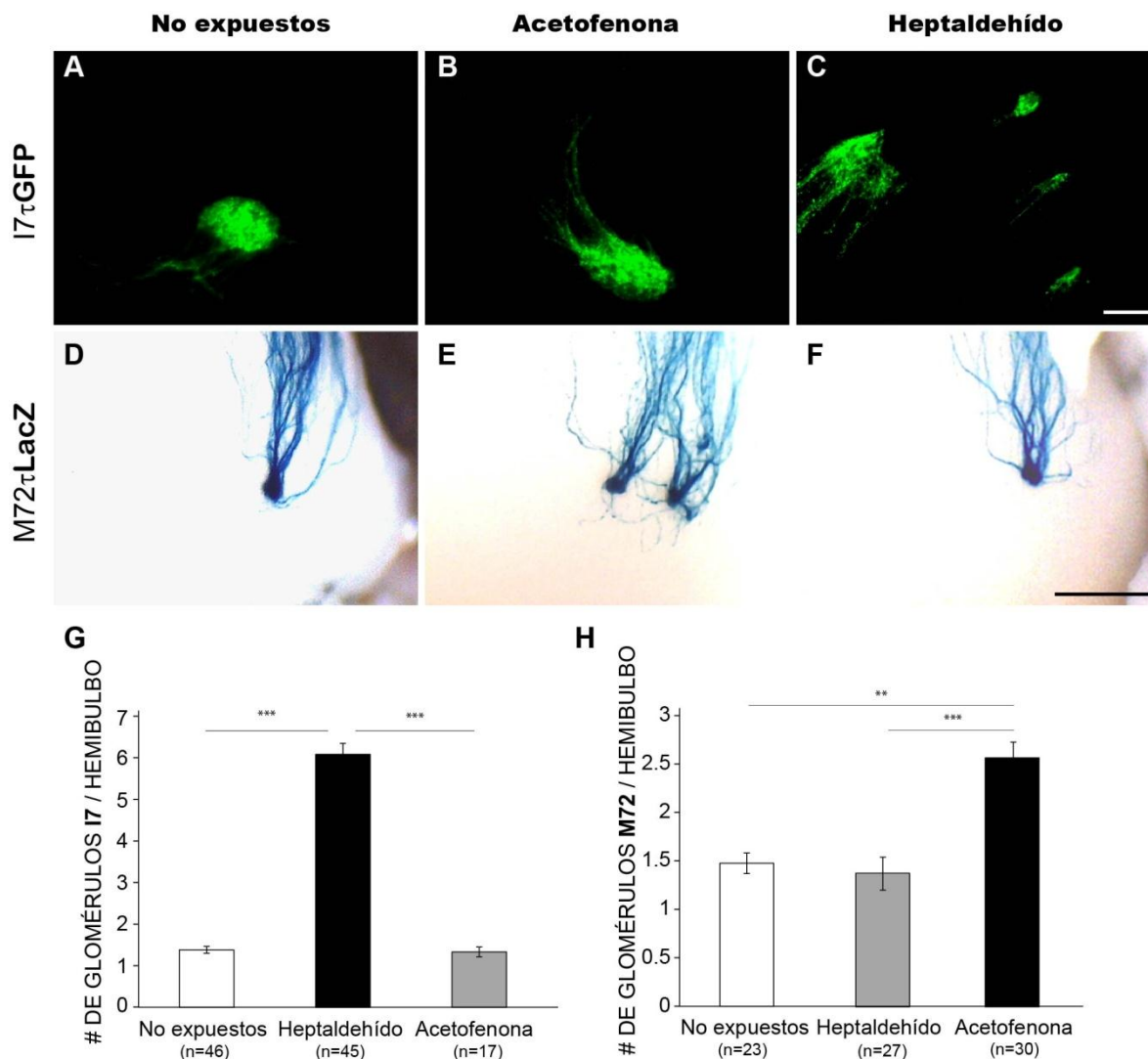


FIGURA 10: La exposición crónica a odorantes (ECO) durante los primeros 20 días de vida causó la formación de glomérulos supernumerarios. Figuras A-C ilustran glomérulos I7 positivos a GFP correspondientes a ratones no expuestos y expuestos a acetofenona o heptaldehído. Escala = 100µm. Figuras D-F ilustran glomérulos M72 positivos a β-galactosidasa, correspondientes a ratones no expuestos y expuestos a acetofenona o heptaldehído. Escala = 500µm. Recordar que el heptaldehído es el ligando del receptor I7 y la acetofenona del M72. Notar el incremento de glomérulos y la especificidad de la respuesta para cada circuito (gráfica de barras G y H). Kruskal-Wallis $P < 0.01$ seguida de comparación múltiple de Dunn: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Por otro lado, en ratones expuestos a heptaldehído, la aparición de los glomérulos supernumerarios I7 se acompañó de una redistribución del volumen de cada uno de ellos con relación al volumen del glomérulo equivalente en ratones no expuestos (FIGURA 11A). A pesar del alto número de glomérulos I7 en expuestos a heptaldehído, aproximadamente la mitad del volumen total se concentró en un sólo glomérulo (Glomérulo mayor) y la otra mitad en los glomérulos supernumerarios (FIGURA 11B).

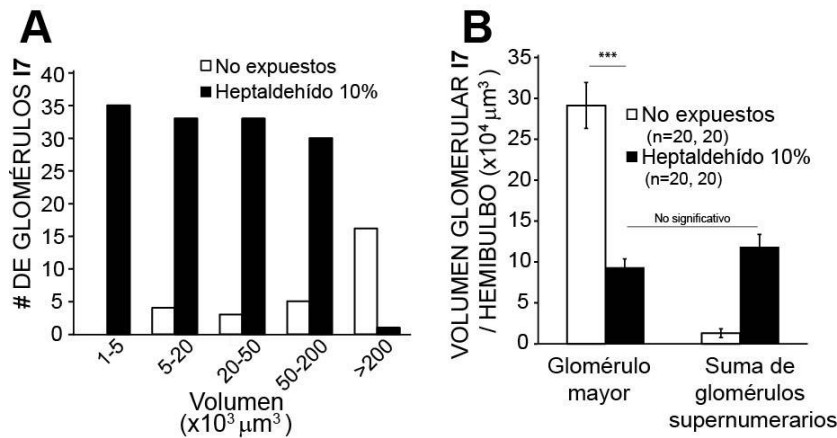


FIGURA 11: La exposición crónica a odorantes (ECO) causó la redistribución del volumen glomerular. El histograma en A muestra la distribución del volumen de la población total de glomérulos en 20 hemibulbos en ratones no expuestos y expuestos a heptaldehído 10% al día P20. La gráfica de barras en B muestra el volumen promedio del glomérulo más grande (mayor) y la suma promedio del volumen de los glomérulos supernumerarios por hemibulbo, en ratones no expuestos y expuestos a heptaldehído. 10%. Kruskal-Wallis $p < 0.01$ seguida de comparación múltiple de Dunn: *******, $P < 0.001$.

De manera interesante, al nacimiento, la mayoría de los hemibulbos tienen un glomérulo I7 formado (FIGURA 12), lo cual sugiere que los glomérulos supernumerarios I7 pueden ser formados después de la formación inicial del glomérulo I7. Esta idea es apoyada por la evidencia que en ratones expuestos a heptaldehído a partir del día P5 y P10 también se generó una gran cantidad de glomérulos supernumerarios (FIGURA 13).

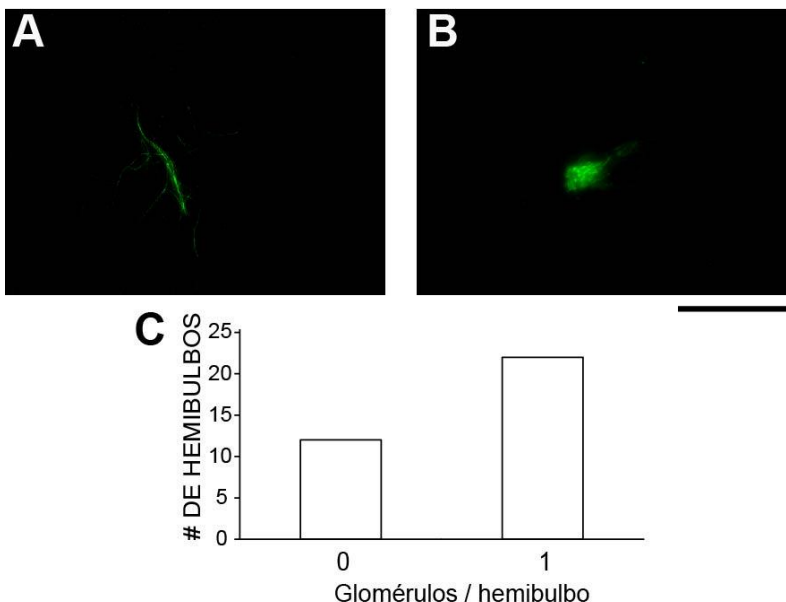


FIGURA 12: Los ratones al nacimiento tienen 64% de sus hemibulbos con un glomérulo I7 formado. Las figuras A y B muestran axones y glomérulo I7, respectivamente, justo después del nacimiento. Escala = 100μm. Se observaron dos diferentes posibilidades: hemibulbos con axones I7 dispersos de una forma local pero sin coalescer (A), y

hemibulbos con axones I7 coalesciendo formando un glomérulo (B). Las poblaciones fueron separadas cualitativamente, y se encontró que 22 de 34 hemibulbos (64%) analizados tenían al menos un glomérulo I7 formado.

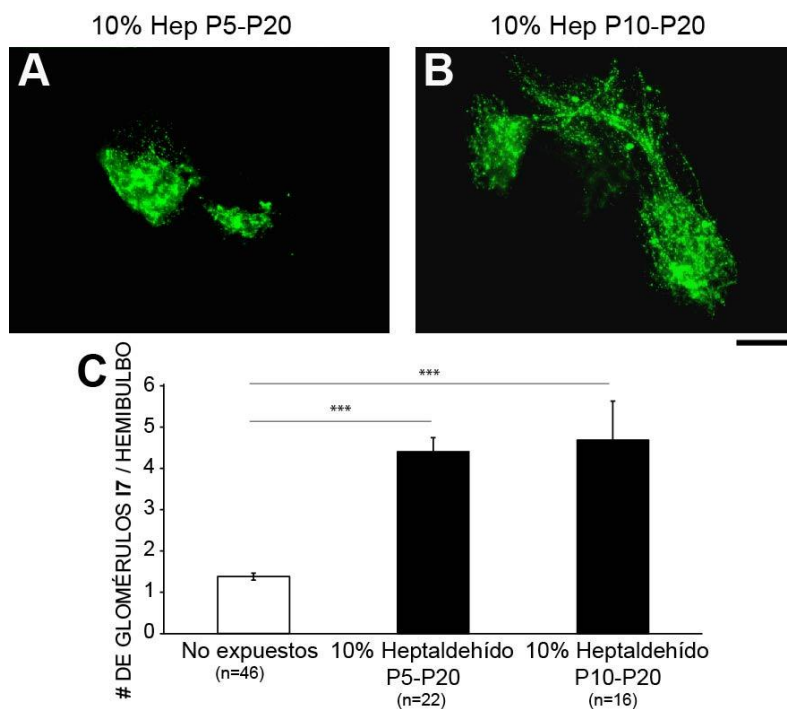


FIGURA 13: La ECO después del día posnatal 5 (P5) y P10 generó glomérulos supernumerarios. Las figuras A y B muestran glomérulos I7 positivos a GFP en ratones expuestos a heptaldehído 10% (10% Hep). Escala = 100 μ m. La gráfica de barras en C muestra el número promedio de glomérulos I7 por hemibulbo en cada condición experimental. Kruskal-Wallis $p < 0.01$ seguido de comparación múltiple de Dunn: ***, $P < 0.001$.

10.3. FORMACIÓN DE GLOMÉRULOS SUPERNUMERARIOS POR ECO DEPENDIÓ DE LA CONCENTRACIÓN DEL ODORANTE

Los ratones expuestos a heptaldehído mostraron un aumento en el número de glomérulos supernumerarios I7 dependiente de la dosis, siendo la de 10% en la que se encontró el mayor aumento (FIGURA 14).

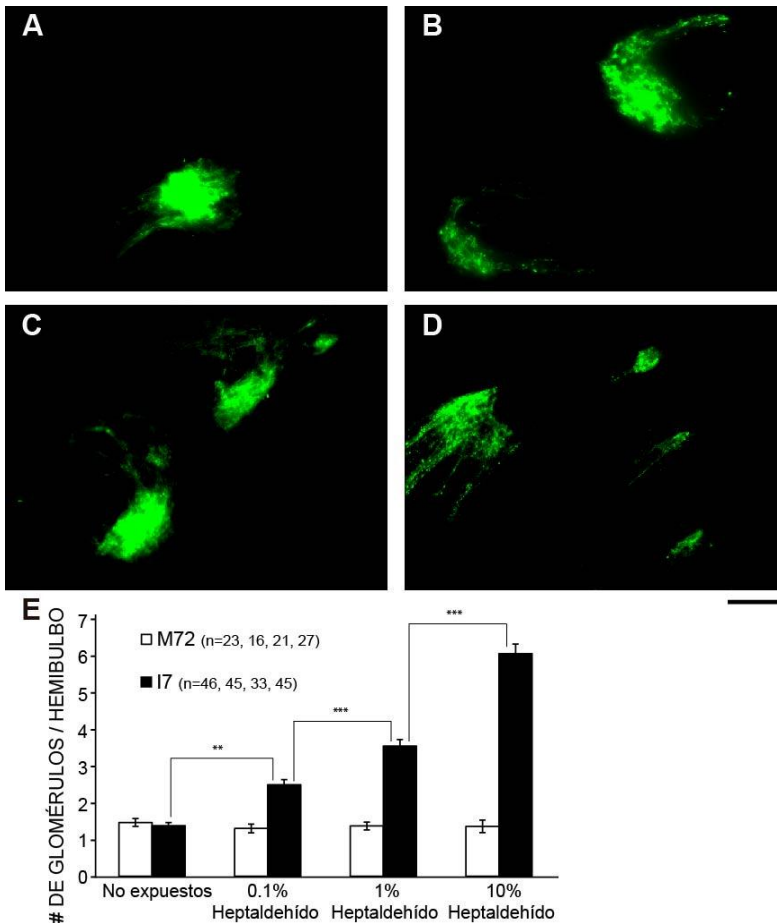


FIGURA 14: La formación de glomérulos supernumerarios por ECO dependió de la concentración del odorante. La figura muestra glomérulos I7 positivos a GFP al día P20 correspondientes a: ratones no expuestos (A), expuestos a heptaldehído 0.1% (B), expuestos a heptaldehído 1% (C), y expuestos a heptaldehído 10% (D). Escala = 100µm. La gráfica de barras en E muestra el número promedio de glomérulos I7 y M72 por hemibulbo a concentraciones crecientes de heptaldehído. Kruskal-Wallis $P < 0.01$ seguida de comparación múltiple de Dunn: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

10.4. GLOMÉRULOS SUPERNUMERARIOS PERMANECIERON Y AUMENTARON SU VOLUMEN DESPUÉS DE LA INTERRUPCIÓN DE LA ECO

El refinamiento glomerular es un proceso frecuente durante el desarrollo (Zou *et al.*, 2004). Por lo tanto, decidimos examinar si los glomérulos supernumerarios generados durante la etapa postnatal permanecen hasta la etapa adulta o si se refinan. Se expuso un grupo de ratones a heptaldehído 10% durante la etapa postnatal temprana (día P0-P20). No hubo cambios estadísticamente significativos en el número promedio de glomérulos I7 por hemibulbo del día P20 al P50 (FIGURA 15). Esto quiere decir que no hay refinamiento de glomérulos supernumerarios después de la ECO. De manera coincidente se encontró que en los ratones no expuestos no existe refinamiento de glomérulos I7 y M72, durante todo el desarrollo postnatal (FIGURA 9).

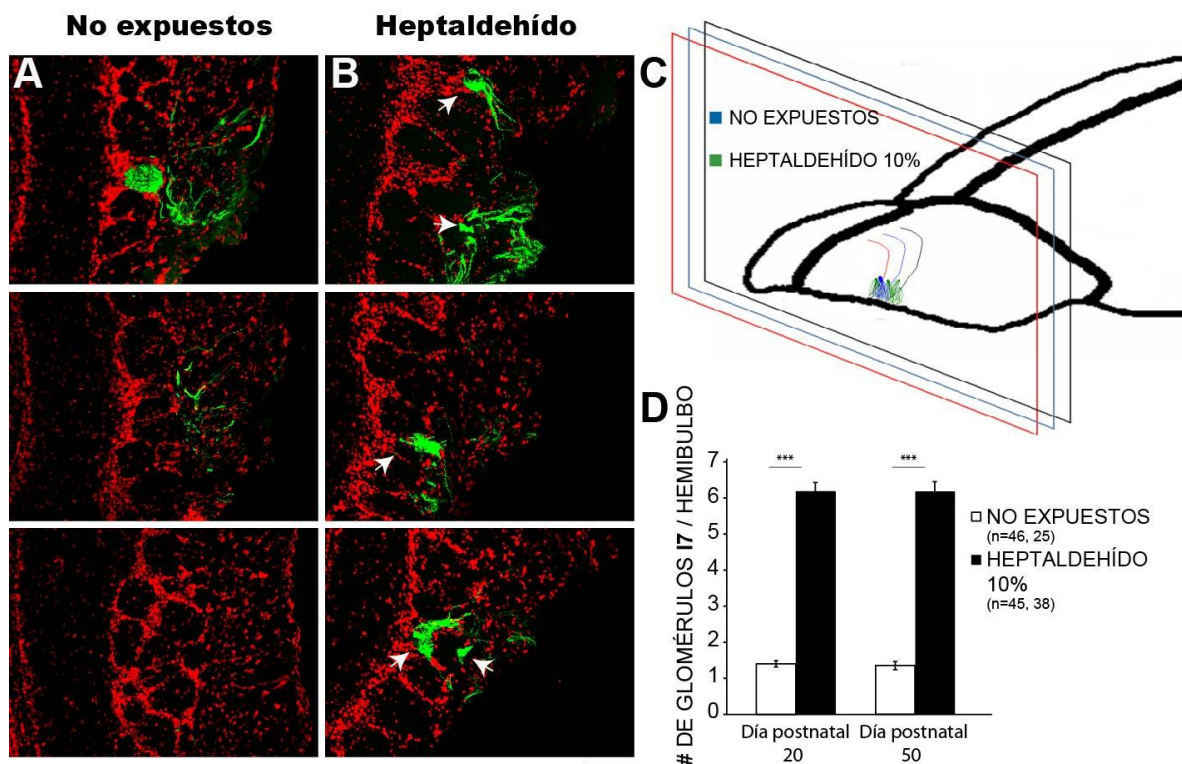


FIGURA 15: Los glomérulos supernumerarios permanecieron después de la interrupción de la ECO. Las figuras A y B muestran glomérulos 17 (verde) en cortes coronales teñidos con DAPI (rojo) correspondientes a ratones no expuestos y expuestos a heptaldehído 10%, y mantenidos hasta el día P50 sin el odorante. Las flechas muestran los glomérulos supernumerarios. Escala = 100 μ m. La figura en C muestra un esquema representativo del bulbo olfatorio que indica la posición anterior ventro-lateral de los glomérulos 17 correspondientes a ratones no expuestos y expuestos a heptaldehído 10%, la posición es prácticamente la misma. La gráfica de barras en D muestra el número de glomérulos 17 por hemibulbo 30 días después de la interrupción de la ECO. Kruskal-Wallis $P < 0.01$ seguida de comparación múltiple de Dunn: ***, $P < 0.001$.

El aumento de tamaño de los glomérulos es un parámetro de maduración del circuito (Pomeroy *et al.*, 1990), por lo tanto se decidió estudiar si los glomérulos supernumerarios aumentaban de tamaño. Se encontró que al día P50 el volumen es mayor con respecto al día P20 (FIGURA 16).

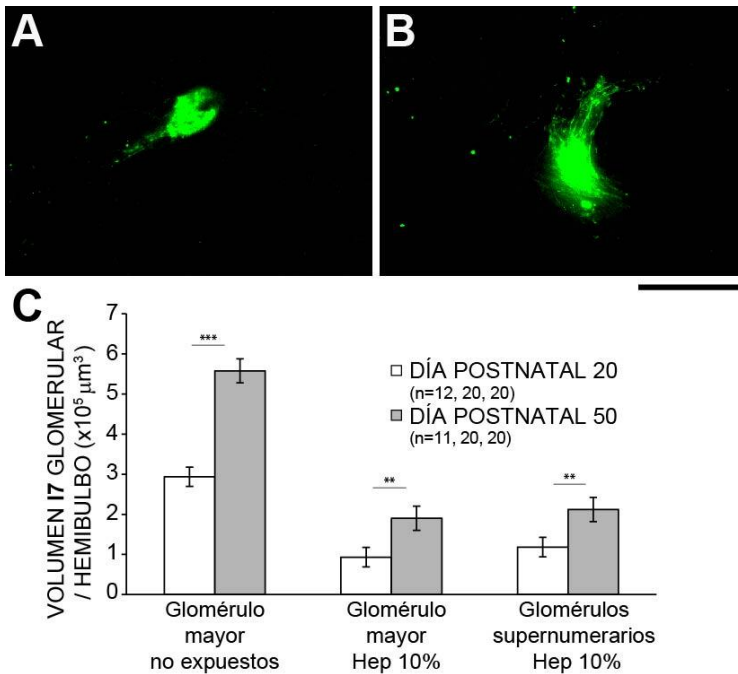


FIGURA 16: Los glomérulos supernumerarios aumentaron su volumen después de la interrupción de la ECO. Las figuras A y B muestran glomérulos I7 GFP positivos al día P20 y P50, respectivamente, en ratones expuestos a heptaldehído 10%. Escala = 100 μm . La gráfica de barras en C muestra el volumen I7 glomerular por hemibulbo, al día P20 y P50, del glomérulo mayor en no expuestos, y del glomérulo mayor y de los glomérulos supernumerarios en expuestos a heptaldehído 10% (Hep 10%). Prueba T no pareada: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

10.5. FORMACIÓN DE GLOMÉRULOS SUPERNUMERARIOS POR ECO OCURRIÓ DURANTE UN PERIODO SENSIBLE DEL DESARROLLO

La actividad sensorial a menudo modula el desarrollo de las proyecciones sensoriales dentro de un periodo de tiempo particular. En general, es el periodo postnatal temprano, durante el cual el cerebro es especialmente plástico (Hubel y Wiesel, 1970; Grubb y Thomson, 2004). Para evaluar si la formación de glomérulos supernumerarios por ECO se limita a un periodo sensible, se compararon los efectos de la ECO durante la etapa postnatal temprana (día P0-P20) y durante la edad adulta (P50-P70). Se encontró que cuando la ECO se inicia en la etapa adulta, no se forman glomérulos supernumerarios (FIGURA 17).

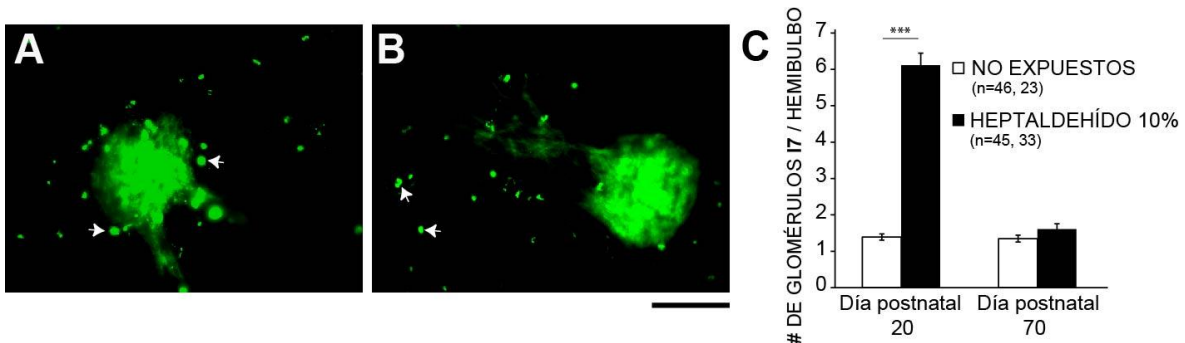


FIGURA 17: La ECO no forma glomérulos supernumerarios en la etapa adulta. Las figuras A y B muestran glomérulos I7 GFP positivos correspondientes a ratones no expuestos y ratones expuestos a heptaldehído 10% durante la adultez, respectivamente. Las flechas blancas señalan la autofluorescencia de las células periglomerulares, siendo común en los adultos. Escala = 100µm. La gráfica de barras en C muestra el número promedio de glomérulos por hemibulbo en ratones expuestos durante la etapa postnatal temprana (día P0-P20) y la edad adulta (P50-P70). Mann-Whitney: *, $P < 0.001$.**

10.6. REORGANIZACIÓN LOCAL DE LAS AFERENTES PRIMARIAS GLOMERULARES DURANTE LA ECO

La redistribución del volumen y la cercanía topológica entre los glomérulos supernumerarios I7 y M72 sugirió que un crecimiento local re-dirigido de las aferentes primarias podría ser la base de la formación de los glomérulos supernumerarios en ratones expuestos a odorantes. Para evaluar esta posibilidad, analizamos los glomérulos I7, cinco días después del inicio de la ECO. Las aferentes primarias de los ratones no expuestos mostraron un punto de destino único al día P5 (FIGURA 18). En contraste, los ratones expuestos a heptaldehído mostraron aferentes que unen a los glomérulos mayores y a los glomérulos supernumerarios. Éste fue el caso para los ratones expuestos a diferentes dosis de heptaldehído entre día P0 y P5 (FIGURA 18). El mismo fenómeno se observó en ratones expuestos entre el día P10 y P15. Estas observaciones apoyan la idea de que la reorganización axonal local podría contribuir a la formación de glomérulos supernumerarios y que las aferentes primarias muestran una fase de crecimiento axonal que se prolongó al menos dos semanas después del nacimiento en las condiciones experimentales estudiadas (FIGURA 18). Otra posibilidad que podría contribuir al fenómeno de glomérulos supernumerarios sería la neurogénesis de las neuronas sensoriales olfatorias que incorpora nuevas fibras al bulbo olfatorio de forma continua (Kawauchi et al., 2004); lo cual necesita ser explorado en otros estudios. Un hallazgo más relacionado a la reorganización de las aferentes primarias fue que a pesar que los glomérulos supernumerarios y mayor aumentaron su volumen durante el desarrollo postnatal (FIGURA 16), el volumen glomerular total no fue mayor que el volumen del glomérulo correspondiente en ratones no expuestos, al menos al día P20 (FIGURA 19). Esto podría significar que las aferentes primarias redistribuyeron el volumen entre el glomérulo mayor y los glomérulos supernumerarios.

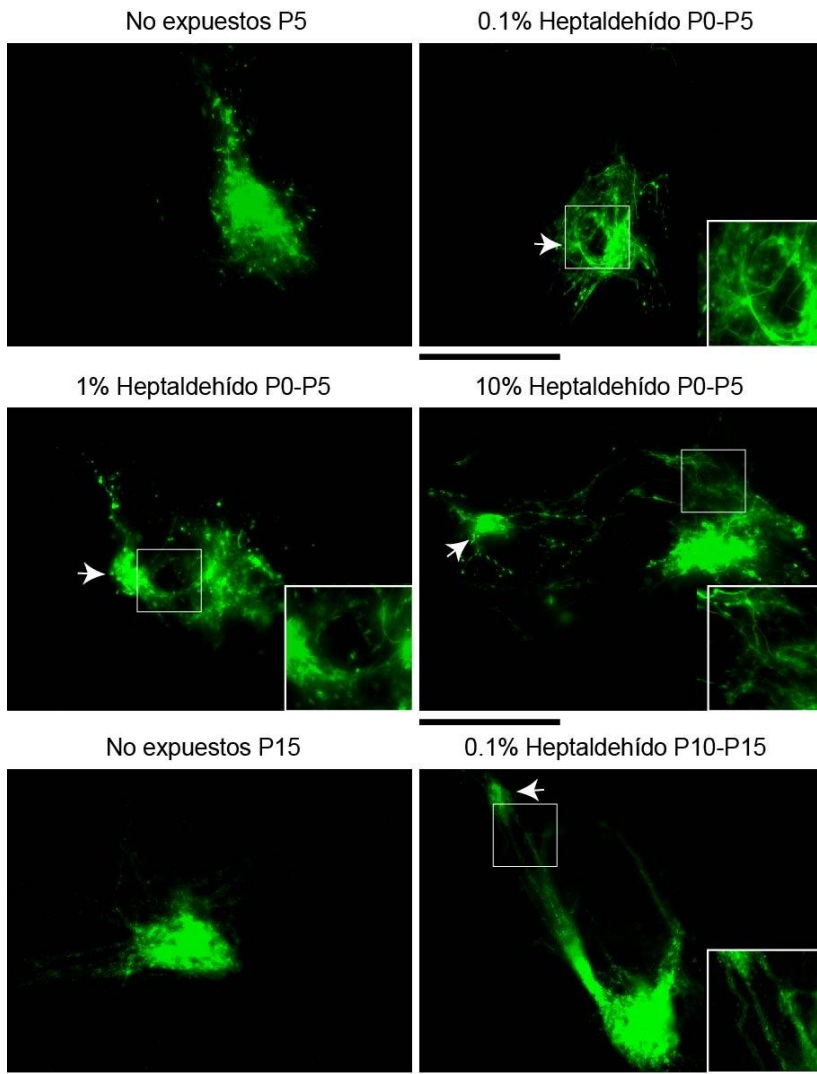


FIGURA 18: Reorganización de las aferentes primarias durante la ECO. La figura muestra glomérulos I7 positivos a GFP correspondientes a ratones no expuestos y expuestos a heptaldehído. Notar que las aferentes primarias se reorganizan de formas variables entre los glomérulos mayores y los glomérulos supernumerarios (flechas). El efecto se observó en todos los hemibulbos analizados (n = 10 en cada condición) en ratones expuestos del día P0 al día P5. En ratones expuestos del día P10 al día P15 se observó en 8 de 10 hemibulbos analizados. Escala = 100 μ m; cuadro interior tiene magnificación 2X.

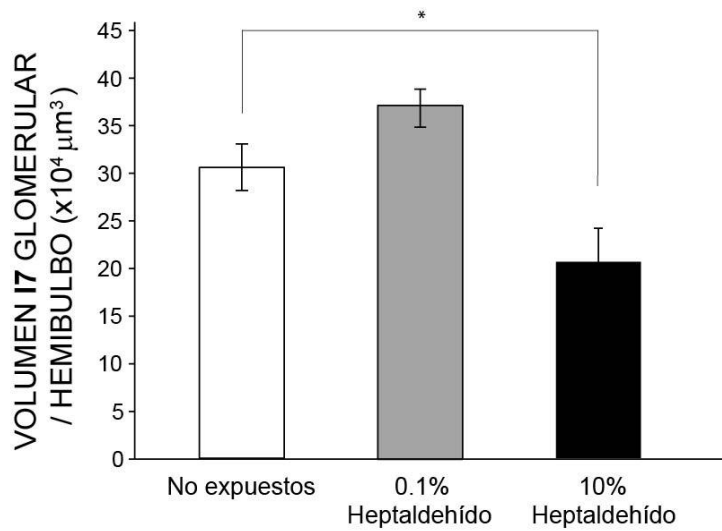


FIGURA 19: La ECO no lleva al aumento del volumen glomerular total. En la gráfica de barras se aprecia que en ninguna de las dos condiciones de expuestos a heptaldehído (0.1% y 10%), a pesar de haber más glomérulos, hay un volumen glomerular total / hemibulbo aumentado, incluso a heptaldehído 10% existe una disminución significativa con respecto al control. Comparación múltiple de Dunnett: *, $P < 0.05$.

11. DISCUSIÓN

Es bien sabido que la experiencia sensorial induce el refinamiento, remodelación y plasticidad de circuitos neuronales en el cerebro en desarrollo (Hubel y Wiesel, 1970; Shatz y Stryker, 1978; LeVay *et al.*, 1980; Schmidt *et al.*, 2002; Grubb y Thomson, 2004; Alonso *et al.*, 2006; Clem *et al.*, 2008; Dunfield y Hass, 2009; Di Marco *et al.*, 2009; Case *et al.*, 2011; Carrasco *et al.*, 2011). Sin embargo, con respecto a la formación inicial de los circuitos, se piensa que la actividad espontánea a través de los diferentes relevos sinápticos es precisamente el factor que promueve su formación (Katz y Shatz, 1996; Grubb y Thomson, 2004; Yu *et al.*, 2004; Feller, 2009; Xu *et al.*, 2011). A pesar de estas ideas, el presente trabajo provee evidencias a favor del papel que tiene la experiencia sensorial acerca de la formación de glomérulos olfatorios, ya que la exposición crónica a odorantes induce a su vez la formación de glomérulos supernumerarios de manera dependiente de la dosis y del tiempo de desarrollo. En específico, la exposición a heptaldehído y acetofenona durante los primeros 20 días de vida postnatal conllevó a la formación permanente de glomérulos I7 y M72, respectivamente. La exposición a acetofenona no resultó en la formación de glomérulos I7, ni la exposición a heptaldehído a glomérulos M72. Estas modificaciones sólo sucedieron cuando la exposición se realizó durante el desarrollo postnatal temprano, no durante la adultez, y dependieron de la concentración del odorante de forma directa. De manera adicional, no sólo estos glomérulos supernumerarios permanecieron a lo largo del tiempo, sino también crecieron de manera significativa conforme los ratones maduraron. El hecho de que los glomérulos I7 y M72 se forman de manera prenatal y postnatal, respectivamente, sugiere que la experiencia odorífera crónica antes, durante o después de la formación de los glomérulos (FIGURA 10, 13 y 18) promueve la formación de un mayor número de estos circuitos que, proponemos, servirían para el procesamiento de la información olfatoria entrante.

El fenómeno de formación de glomérulos supernumerarios también ha sido reportado en otros estudios. En realidad, se ha documentado en ratones modificados genéticamente en los que se altera la expresión de moléculas para la guía de axones (Nguyen-Ba-Charvet *et al.*, 2008). Por lo tanto, nuestros resultados pueden ser en parte explicados por la diferencia en la disponibilidad de estas moléculas (*e.g.*, señales de repulsión o adhesión, Serizawa *et al.*, 2006). En apoyo a esta posibilidad, se documenta la redistribución del volumen y la cercanía topológica entre los glomérulos supernumerarios I7 y M72, además de la reorganización de las aferentes primarias del glomérulo mayor en ratones expuestos a los ligandos odorantes agonistas, incluso después de la formación glomerular inicial (FIGURA 13). De manera complementaria o alternativa, nuestros resultados pueden ser atribuidos a patrones modificados de actividad espontánea y/o actividad presináptica y/o postsináptica (O'Rourke *et al.*, 1994; Zou *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004; Oliva *et al.*, 2008; Mobley *et al.*, 2010), a cambios en la disponibilidad de AMPc asociados a la actividad del receptor a odorantes (Imai *et al.*, 2006; Mobley *et al.*, 2010), a la activación diferencial de la proteína G o de la adenilato ciclasa (Imai *et al.*, 2006; Chesler *et al.*, 2007; Biju *et al.*, 2008) y/o a cambios en la disponibilidad de BDNF (Cao *et al.*, 2007; Oliva *et al.*, 2008). Todos

estos factores modifican el grado de coalescencia y arborización de las aferentes primarias olfatorias, y la distribución espacial y número de los glomérulos. El mérito de cualquiera de estas posibilidades es digno de consideración en futuros estudios.

A diferencia de otros estudios similares que analizan el efecto de la exposición a odorantes a través de la madre (ingesta de los odorantes y aplicación de odorantes en la teta), durante la etapa fetal y la etapa postnatal temprana (Kerr y Belluscio, 2006; Todrank *et al.*, 2011), nuestro estudio se centró en el efecto de la exposición independiente de la madre, también llamada exposición no condicionada (Kerr y Belluscio, 2006). La importancia de esto se relaciona a los efectos diferenciales sobre el número de repeticiones y tamaño de los glomérulos. La exposición a través de la madre provoca un aumento en el tamaño de los glomérulos activados y acelera su refinamiento (Kerr y Belluscio, 2006; Todrank *et al.*, 2011), mientras que nuestros resultados muestran una disminución en el tamaño y aumento en el número de los glomérulos nominalmente activados en respuesta a la exposición crónica a odorantes (ECO) (Ver resultados similares en Oliva *et al.*, 2010). Las razones de tal discrepancia no están claras; sin embargo, de laboratorio a laboratorio se reportan comúnmente diferencias en el número de glomérulos P2 y M72 en el bulbo olfatorio (Zou *et al.*, 2004; Biju *et al.*, 2008; Mombaerts *et al.*, 2004; Royal y Key, 1999; Zheng *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Schaefer *et al.*, 2001), una circunstancia que se ha sugerido es debida a diferencias en el ambiente olfatorio (Oliva *et al.*, 2010). De este modo, los estudios futuros deben comparar los diferentes protocolos de exposición a odorantes para evaluar diferentes respuestas plásticas en la población de glomérulos, entre otras posibilidades, tal como se ha sugerido previamente (Todrank *et al.*, 2011).

Existen dos modelos que pueden explicar los cambios que se producen en los circuitos neuronales durante la etapa postnatal temprana: el primero es el constructivista en el cual el número de unidades neuronales (neuronas, sinápsis o módulos) aumentan en número durante el desarrollo (Pomeroy *et al.*, 1990; Quartz y Sejnowski, 1997). El otro modelo es el seleccionista, en el cual el número de unidades tiende a reducirse durante el desarrollo, siendo este proceso guiado principalmente por la actividad sensorial (Pomeroy *et al.*, 1990; Quartz y Sejnowski, 1997; Zou *et al.*, 2004; Di Marco *et al.*, 2009). Para el caso del circuito glomerular se han encontrado evidencias contradictorias. Por un lado se ha reportado el aumento progresivo en la población total de glomérulos olfatorios durante el desarrollo postnatal temprano y, por el otro, se ha documentado refinamiento progresivo de glomérulos supernumerarios de algunos circuitos específicos (Pomeroy *et al.*, 1990; Zou *et al.*, 2004; Kerr y Belluscio, 2006).

El presente trabajo indica que durante la plasticidad en respuesta a la ECO, se generan y consolidan glomérulos supernumerarios de manera independiente de un proceso de refinamiento. En ningún caso se observó la disminución del número de glomérulos ni en ratones control ni en los expuestos. Sin embargo, es de notarse que este proceso no conllevó al aumento total del volumen glomerular de cada circuito (FIGURA 19), es decir, muy probablemente el aumento del número de glomérulos ocurrió a expensas de la reorganización de las fibras del glomérulo mayor (FIGURA 18). Estos resultados son

compatibles con la idea final que, al menos en respuesta a la ECO antes, durante o después de la formación glomerular, el bulbo olfatorio utiliza una estrategia constructivista de desarrollo altamente dinámica en respuesta a las demandas sensoriales.

12. RECOPIACIÓN Y CONCLUSIONES

1. La exposición crónica a odorantes (ECO) durante la etapa postnatal temprana produce glomérulos supernumerarios cuando se utiliza el ligando odorante específico del circuito.
2. El número de glomérulos supernumerarios generados por la ECO se relaciona con la concentración del odorante.
3. Los glomérulos supernumerarios pasan por un periodo de maduración en el que aumentan de tamaño.
4. La generación de glomérulos supernumerarios por ECO tiene un periodo sensible restringido a etapas tempranas de desarrollo.
5. La ECO provoca la reorganización o reacomodo de las aferentes primarias entre el glomérulo mayor y los glomérulos supernumerarios.
6. **La generación de glomérulos supernumerarios por ECO es un proceso constructivista.**
7. **La experiencia sensorial tiene un efecto sobre la formación de circuitos neuronales y no sólo sobre su refinamiento.**

13. RELEVANCIA Y PERSPECTIVAS

El constructivismo neuronal es un modelo que explica la formación de circuitos neuronales a lo largo del desarrollo postnatal (Quartz y Sejnowsky, 1997). Este estudio es una evidencia más que apoya esta teoría como mecanismo fundamental para la consolidación de circuitos neuronales hacia la adultez y recalca la importancia de la experiencia sensorial sobre el proceso de formación de los circuitos y no sólo sobre su refinamiento.

El constructivismo neuronal podría ser un fenómeno muy ubicuo en la naturaleza, los experimentos utilizando heptaldehído 0.1% evidencian dicha posibilidad. Si la ECO causó la formación de glomérulos I7 utilizando bajas concentraciones de heptaldehído, es muy probable que en el hábitat natural en el que viven los ratones, con la gran diversidad de odorantes, también ocurra.

Es necesario estudiar las consecuencias fisiológicas y conductuales del fenómeno constructivista. En la primera sería estudiar cómo cambian los mapas de activación glomerular en el bulbo olfatorio. La estimulación con cada odorante genera mapas de activación glomerular estereotipados en el bulbo olfatorio (Wachowiak y Cohen, 2003); por lo tanto, debido a que la ECO modifica la anatomía glomerular, sería importante correlacionar ambas variables, lo cual podría explicar posibles cambios en la conducta olfatoria.

Con respecto a la conducta sería importante estudiar los umbrales de detección al odorante agonista utilizado y la capacidad de discriminación en relación con otros odorantes no agonistas, por medio de la utilización de curvas psicofísicas a fin de detectar diferencias sutiles. Proponemos lo anterior debido a que, en los sistemas sensoriales, los umbrales de detección son determinados por las aferentes primarias y discriminación, debido a que la ECO podría cambiar la forma como los ratones perciben el odorante en el largo plazo. El llevar a cabo estas pruebas en el contexto de este fenómeno de plasticidad, permitiría tener una aproximación a una pregunta fundamental en la biología de los seres vivos: ¿Cuál es la relación entre forma y función?.

14. REFERENCIAS

- Adam Y, Mizrahi A (2010) Circuit formation and maintenance--perspectives from the mammalian olfactory bulb. *Curr Opin Neurobiol* 20:134-40.
- Aimé P, Duchamp-Viret P, Chaput MA, Savigner A, Mahfouz M, Julliard AK (2007) Fasting increases and satiation decreases olfactory detection for a neutral odor in rats. *Behav Brain Res* 179:258-64.
- Alonso M, Viollet C, Gabellec MM, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Lledo PM (2006) Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 26:10508-13.
- Araneda RC, Kini AD, Firestein S (2000) The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nat Neurosci* 3:1248-55.
- Biju KC, Marks DR, Mast TG, Fadool DA (2008) Deletion of voltage-gated channel affects glomerular refinement and odorant receptor expression in the mouse olfactory system. *J Comp Neurol* 506:161-79.
- Blankenship AG, Feller MB (2010) Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 11:18-29.
- Bozza T, Feinstein P, Zheng C, Mombaerts P (2002) Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *J Neurosci* 22:3033-43.
- Bronchti G, Schönenberger N, Welker E, Van der Loos H (1992) Barreldfield expansion after neonatal eye removal in mice. *Neuroreport* 3:489-92.
- Cao L, Dhillia A, Mukai J, Blazeski R, Lodovichi C, Mason CA, Gogos JA (2007) Genetic modulation of BDNF signaling affects the outcome of axonal competition in vivo. *J Neurosci* 17:3684-709.
- Carrasco MM, Mao YT, Balmer TS, Pallas SL (2011) Inhibitory plasticity underlies visual deprivation-induced loss of receptive field refinement in the adult superior colliculus. *Eur J Neurosci* 33:58-68.
- Case DT, Zhao X, Gillespie DC (2011) Functional refinement in the projection from ventral cochlear nucleus to lateral superior olive precedes hearing onset in rat. *Plos One* 6:e20756.
- Chen WR, Shepherd GM (2005) The olfactory glomerulus: a cortical module with specific functions. *Journal of Neurocytology* 34, 353–360.
- Chesler AT, Zou DJ, Le Pichon CE, Peterlin ZA, Matthews GA, et al. (2007) A G protein/cAMP signal cascade is required for axonal convergence into olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1039-44.

Clem RL, Celikel T, Barth AL (2008) Ongoing in vivo experience triggers synaptic metaplasticity in the neocortex. *Science*. 319:101-4.

Di Marco S, Nguyen VA, Bisti S, Protti DA (2009) Permanent functional reorganization of retinal circuits induced by early long-term visual deprivation. *J Neurosci* 29:13691-701.

Dunfield D, Haas K (2009) Metaplasticity governs natural experience-driven plasticity of nascent embryonic brain circuits. *Neuron* 64:240-50.

Feinstein P y Mombaerts P (2004) A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* 117:817-31.

Feller MB (2009) Retinal waves are likely to instruct the formation of eye-specific retinogeniculate projections. *Neural Dev* 4:24

Fox SE, Levitt P, Nelson CA 3rd (2010) How the timing and quality of early experiences influence the development of brain architecture. *Child Dev*. Jan-Feb 81:28-40.

Grosmaître X, Vassalli A, Mombaerts P, Shepherd GM, Ma M (2006) Odorant responses of olfactory sensory neurons expressing the odorant receptor MOR23: a patch clamp analysis in gene-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1970-5.

Grubb MS, Thompson ID (2004) The influence of early experience on the development of sensory systems. *Curr Opin Neurobiol* 14:503-12.

Huard JM, Youngentob SL, Goldstein BJ, Luskin MB, Schwob JE (1998) Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells. *J Comp Neurol* 400:469-86.

Hubel DH, Wiesel TN (1970) The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol* 206:419-36.

Imai T, Suzuki M, Sakano H (2006) Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science* 314: 657-61.

Jones DT, Reed RR (1989) Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244:790-5.

Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274:1133-8

Kerr MA, Belluscio L (2006) Olfactory experience accelerates glomerular refinement in the mammalian olfactory bulb. *Nat Neurosci* 9:484-6.

Kiselycznyk CL, Zhang S, Linstner C (2006) Role of centrifugal projections to the olfactory bulb in olfactory processing. *Learn Mem* 13:575-9.

Laissue PP, Reiter C, Hiesinger PR, Halter S, Fischbach KF, Stocker RF (1999) Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 405:543-52.

LeVay S, Wiesel TN, Hubel DH (1980) The development of ocular dominance columns in normal and visually deprived monkeys. *J Comp Neurol* 191:1-51.

Lin DM, Wang F, Lowe G, Gold GH, Axel R, Ngai J, Brunet L (2000) Formation of precise connections in the olfactory bulb occurs in the absence of odorant-evoked neuronal activity. *Neuron* 26:69–80.

Lledo PM, Merkle FT, Alvarez-Buylla A (2008) Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci* 31:392-400.

Maher BJ, McGinley MJ, Westbrook GL (2009) Experience-dependent maturation of the glomerular microcircuit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16865-70.

Meisami E, Sendera TJ (1993) Morphometry of rat olfactory bulbs stained for cytochrome oxidase reveals that the entire population of glomeruli forms early in the neonatal period. *Brain Res Dev Brain Res* 71:253-7.

Merzin M. "Applying stereological method in radiology. Volume measurement." Bachelor's thesis. University of Tartu. 2008.

Mobley AS, Miller AM, Araneda RC, Maurer LR, Müller F, Greer CA (2010) Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in olfactory sensory neurons regulate axon extension and glomerular formation. *J Neurosci*. 30:16498-508.

Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675-86.

Mombaerts P (2006) Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 22:713-37.

Morrison EE, Costanzo RM (1990) Morphology of the human olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 297:1-13.

Nedelec S, Dubacq C, Trembleau A (2005) Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special?. *J Neurocytol* 34:49-64.

Nguyen-Ba-Charvet KT, Di Meglio T, Fouquet C, Chedotal A (2008) Robos and Slits control the pathfinding and targeting of mouse olfactory sensory axons. *J Neurosci* 28:4244-4249.

Nguyen MQ, Zhou Z, Marks CA, Ryba NJ, Belluscio L (2007) Prominent roles for odorant receptor coding sequences in allelic exclusion. *Cell* 131:1009-17.

Oliva AM, Jones KR, Restrepo D (2008) Sensory-dependent asymmetry for a urine-responsive olfactory bulb glomerulus. *J Comp Neurol* 510:475-83.

Oliva AM, Salcedo E, Hellier JL, Ly X, Koka K, Tollin DJ, Restrepo D (2010) Toward a mouse neuroethology in the laboratory environment. *PLoS One* 5:e11359.

O'Rourke NA, Cline HT, Fraser SE (1994) Rapid remodeling of retinal arbors in the tectum with and without blockade of synaptic transmission. *Neuron* 12:921-34.

Pignatelli A, Kobayashi K, Okano H, Belluzzi O (2005) Functional properties of dopaminergic neurones in the mouse olfactory bulb. *J Physiol* 564:501-14.

Pilpel Y, Lancet D (1999) The variable and conserved interfaces of modeled olfactory receptor proteins. *Protein Sci* 8:969-77.

Pomeroy SL, LaMantia AS, Purves D (1990) Postnatal construction of neural circuitry in the mouse olfactory bulb. *J Neurosci* 10:1952-66.

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* 21:9713-23.

Purves D (1994) *Neural activity and the growth of the brain*. Cambridge University Press.

Quartz SR, Sejnowski TJ (1997) The neural basis of cognitive development: a constructivist manifesto. *Behav Brain Sci* 20:537-56.

Royal SJ, Key B (1999) Development of P2 olfactory glomeruli in P2-internal ribosome entry site-tau-LacZ transgenic mice. *J Neurosci* 19:9856-64.

Royet JP, Jourdan F, Ploye H, Souchier C (1989) Morphometric modifications associated with early sensory experience in the rat olfactory bulb: II. Stereological study of the population of olfactory glomeruli. *J Comp Neurol* 289:594-609.

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* 436:351-62.

Schmidt KE, Stephan M, Singer W, Löwel S (2002) Spatial analysis of ocular dominance patterns in monocularly deprived cats. *Cereb Cortex* 12:783-96.

Serizawa S, Miyamichi K, Takeuchi H, Yamagishi Y, Suzuki M, et al. (2006) A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell* 127:1057-69.

Shatz CJ, Stryker MP (1978) Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex and the effects of monocular deprivation. *J Physiol* 281:267-83.

Strowbridge BW (2009) Role of cortical feedback in regulating inhibitory microcircuits. *Ann N Y Acad Sci* 1170:270-4.

- Tan J, Savigner A, Ma M, Luo M (2010) Odor information processing by the olfactory bulb analyzed in gene-targeted mice. *Neuron* 65:912-26.
- Todrank J, Heth G, Restrepo D (2011) Effects of in utero odorant exposure on neuroanatomical development of the olfactory bulb and odour preferences. *Proc Biol Sci* 278:1949-55.
- Valverde F, Santacana M, Heredia M (1992) Formation of an olfactory glomerulus: morphological aspects of development and organization. *Neuroscience* 49:255-75.
- Wachowiak M, Cohen LB (2003) Correspondence between odorant-evoked patterns of receptor neuron input and intrinsic optical signals in the mouse olfactory bulb. *J Neurophysiol* 89:1623-39.
- Wachowiak M, Denk W, Friedrich RW (2004) Functional organization of sensory input to the olfactory bulb glomerulus analyzed by two-photon calcium imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9097-102.
- Xu HP, Furman M, Mineur YS, Chen H, King SL, et al. (2011) An instructive role for patterned spontaneous retinal activity in mouse visual map development. *Neuron* 70:1115-27
- Yan Z, Tan J, Qin C, Lu Y, Ding C, Luo M (2008) Precise circuitry links bilaterally symmetric olfactory maps. *Neuron* 58:613-24.
- Yu CR, Power J, Barnea G, O'Donnell S, Brown HE, Osborne J, Axel R, Gogos JA. (2004) Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron* 42:553-66.
- 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.
- Zou DJ, Feinstein P, Rivers AL, Mathews GA, Kim A, Greer CA, Mombaerts P, Firestein S (2004) Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Science* 304:1976-9.

Supernumerary Formation of Olfactory Glomeruli Induced by Chronic Odorant Exposure: A Constructivist Expression of Neural Plasticity

Pablo Valle-Leija¹, Eduardo Blanco-Hernández¹, Rene Drucker-Colín¹, Gabriel Gutiérrez-Ospina^{2*}, Roman Vidaltamayo^{3*}

1 Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México Distrito Federal, México, **2** Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas y Coordinación de Psicofisiología, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, México Distrito Federal, México, **3** Departamento de Ciencias Básicas, Centro de Diagnóstico Molecular y Medicina Personalizada, Universidad de Monterrey, Garza García, Nuevo León, México

Abstract

It is accepted that sensory experience instructs the remodelling of neuronal circuits during postnatal development, after their specification has occurred. The story is less clear with regard to the role of experience during the initial formation of neuronal circuits, whether prenatal or postnatal, since this process is now supposed to be primarily influenced by genetic determinants and spontaneous neuronal firing. Here we evaluated this last issue by examining the effect that postnatal chronic exposure to cognate odorants has on the formation of I7 and M72 glomeruli, iterated olfactory circuits that are formed before and after birth, respectively. We took advantage of double knock-in mice whose I7 and M72 primary afferents express green fluorescent protein and β -galactosidase, correspondingly. Our results revealed that postnatal odorant chronic exposure led to the formation of permanent supernumerary I7 and M72 glomeruli in a dose and time dependent manner. Glomeruli in exposed mice were formed within the same regions of olfactory bulb and occupy small space volumes compared to the corresponding single circuits in non-exposed mice. We suggest that local reorganization of the primary afferents could participate in the process of formation of supernumerary glomeruli. Overall, our results support that sensory experience indeed instructs the permanent formation of specific glomeruli in the mouse olfactory bulb by means of constructivist processes.

Citation: Valle-Leija P, Blanco-Hernández E, Drucker-Colín R, Gutiérrez-Ospina G, Vidaltamayo R (2012) Supernumerary Formation of Olfactory Glomeruli Induced by Chronic Odorant Exposure: A Constructivist Expression of Neural Plasticity. PLoS ONE 7(4): e35558. doi:10.1371/journal.pone.0035558

Editor: Hiroaki Matsunami, Duke University, United States of America

Received: December 8, 2011; **Accepted:** March 14, 2012; **Published:** April 12, 2012

Copyright: © 2012 Valle-Leija et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by CONACYT grant 50295 to R.Vidaltamayo and UNAM-OSAPA-PAPIIT grants IN208311 to R.Vidaltamayo and IN213109 to R.Drucker-Colín. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: gabot@biomedicas.unam.mx (GG-O), vidaltamayo@udem.mx (RV)

Introduction

Unraveling the mechanisms by which neuronal circuits in sensory systems are formed and refined until reaching their mature configuration has been one of the major challenges in the field of developmental neurobiology. Based on the seminal work conducted in the cat and monkey's visual system by Hubel and Wiesel during the 1960's and 70's and on more recent developments, most contemporary neurobiologists would agree that sensory experience plays an instructional role on sensory circuit refinement and plasticity [1–11]. The story is not different in the rodent olfactory bulb where the experimental data available support the notion that the organization and refinement of the anatomical layout of these circuits are highly sensitive to experience [12–16]. Nevertheless, the participation of experience during the initial formation of sensory circuits is still under debate because the evidence so far published supports that it is the spontaneous activity going on across related neuronal assemblies what instructs the early specification and formation of such circuits during the ontogeny [9,17–20]. Accordingly, in the olfactory bulb, the suppression of spontaneous firing in a selective subset of olfactory

sensory neurons prevents the formation of their corresponding circuits [18]. In spite of these results, evidence showing mice displaying odorant preference and enlarged glomerular size following the prenatal and early postnatal exposure to acetophenone and isopropyl tiglate [21], opens the possibility that sensory experience may indeed influence brain circuit formation earlier than previously thought. In this regard, the olfactory bulb seems an adequate model to explore influences of early sensory experience on circuit specification and formation since some olfactory glomeruli are formed before birth, but some others form postnatally [22]. The fact that primary afferents associated with specific olfactory sensory neurons in the olfactory mucosa converge onto specific, easily identifiable glomeruli [15,23,24], provides with a unique opportunity to assess the effects of sensory experience on the initial steps of glomeruli formation using exposure to distinct odorants. Hence, in this paper we took advantage of both features to monitor the formation of specific glomeruli following chronic odorant exposure using mice having I7 and M72 olfactory receptors (ORs) tagged with green fluorescent protein (I7::mGFP) and β -galactosidase (M72::mLacZ), respectively. Specific stimulation was achieved by exposing the

mice to heptaldehyde or acetophenone, the cognate ligands of I7 and M72 ORs, respectively [24–26].

Results

Chronic exposure to cognate odorants during the first twenty days of life induced the formation of odor-specific supernumerary glomeruli

The effect of chronic odorant exposure on olfactory glomerular formation was first evaluated by continuously exposing I7^{Cre}/M72^{Cre}/lacZ mice to either heptaldehyde or acetophenone, from birth to 20 days of age. In both cases, chronic exposure to the cognate odorant bilaterally increased the number of specific glomeruli in the olfactory bulb (Figure 1). This effect was odor-specific since neither heptaldehyde nor acetophenone increased the number of M72 or I7 glomeruli, respectively (Figure 1). Also, the fact that all the results were observed in double knock-in mice having the same genetic background and the formation of supernumerary glomeruli was dose-dependent further support the specificity of the response (Figure 1). An interesting finding was that most glomeruli in exposed mice were small in size (Figure 2A and 2B), one half of their total volume in each half bulb was confined to one glomerulus (named Largest) approximately, and the other half corresponded to supernumerary glomeruli (Figure 2B). Equally important was that supernumerary glomeruli always occupied locations close (<700 μ m linear distance) to the largest glomerulus, thus emphasizing their relatedness. Interestingly, most bulbs analyzed showed I7 glomeruli already formed at birth (Figure S1). This suggests that supernumerary glomeruli can be formed after the initial formation of the I7 glomerulus, as supported by the observation made in mice exposed after postnatal day (PD) 5 and PD10 (Figure S2).

Supernumerary glomeruli persisted into adulthood and continued to grow after odorant exposure

Glomerular elimination has been claimed to be a common feature during olfactory bulb postnatal remodeling [12,13], although see [27]. Hence, we examined whether I7 and M72 supernumerary glomeruli induced by chronic exposure to cognate odorants endure as animals mature, even if I7^{Cre}/M72^{Cre}/lacZ mice were no longer exposed to the corresponding odorants. In both cases, the number of supernumerary glomeruli not only remained constant (Figure 3 shows data for I7 glomeruli, not for M72 glomeruli), but underwent significant growth in size (Figure 4). Similarly, non-exposed mice kept constant the number of glomeruli throughout their life (Figure S3). Additionally, in adulthood, the spatial position of glomeruli in exposed mice was approximately the same as non-exposed mice (Figure 3C).

The specific formation of supernumerary glomeruli occurred during a sensitive period of postnatal development

Sensory experience often modulates the development of sensory projections within a restricted temporal window [15,19,13]. We then compared the likelihood to induce the formation of supernumerary I7 glomeruli in the adult mice. Adults exposed to the highest heptaldehyde concentration during 20 days were unable to increase the number of I7 glomeruli by the end of exposure period (Figure 5).

Local primary afferent reorganization occurred during chronic odorant exposure

Volume redistribution and topological closeness among supernumerary I7 and M72 glomeruli suggested that redirected, but precise, local primary afferent growth could underlie the formation of supernumerary I7 and M72 glomeruli in odorant exposed mice. Accordingly, primary afferents associated to the I7 circuit showed a single target spot in the olfactory bulb of non-exposed mice at postnatal day (PD) 5 (Figure 6). In contrast, heptaldehyde exposed mice displayed afferents coming out from the largest glomerulus that targeted what seemed to be secondary glomeruli. This was true for mice exposed to different doses of heptaldehyde between PD0 and PD5 (Figure 6). The same phenomenon was also observed in mice exposed between PD10 and PD15. These observations then support that axonal reorganization could contribute to supernumerary glomeruli formation and that olfactory primary afferents displayed a protracted phase of axonal growth that lasted for at least two weeks after birth under the experimental conditions tested (Figure 6). Another related finding was that even though, in exposed mice, the largest glomerulus and supernumerary glomeruli increased their volume as postnatal development proceeded (Figure 4C), the total glomerular volume was not greater than the volume of the corresponding glomerulus in non-exposed mice, at least by PD20 (Figure S4). This could mean that primary afferents re-distribute the volume between the largest and supernumerary glomeruli.

Discussion

It is well established that sensory experience instructs the refinement and plasticity of sensory circuits in the developing brain [1–11]. The initial formation and overall layout of neuronal circuits, however, is thought to heavily depend upon spontaneous patterns of neuronal activation across the different synaptic relays that constitute each developing sensory pathway [5,17–20], including the olfactory system [18]. In spite of these ideas, the present work provides evidence supporting that early olfactory experience instructs the formation of olfactory glomeruli in a way that is odor and circuit specific. Indeed, heptaldehyde and acetophenone exposure during the first twenty days of life led to the formation of permanent supernumerary I7 and M72 olfactory glomeruli in mice, respectively. Exposure to acetophenone did not result in supernumerary I7 glomeruli nor did supernumerary M72 glomeruli to heptaldehyde. These adjustments took place only when mice were exposed when young, and seemed to depend on the salience of the olfactory stimuli since their occurrence was dose dependent. In addition, not only these supernumerary glomeruli endured over time, but they also grew significantly as animals mature. The fact that I7 and M72 glomeruli are formed pre- (Figure S1) and postnatally [22,23], respectively, suggests that chronic olfactory experience before, during or after glomerular formation (Figure 1, 6 and S2) promotes the formation of a greater number of olfactory iterated circuits presumably destined to the processing of information associated with salient specific odors.

Our study, nonetheless, is not the first in reporting increased number of specific glomeruli in mice. They frequently occur in mice that have been genetically engineered to alter the expression of axon guidance molecules [29]. Hence, our results may in part be explained by differences in axon guidance molecules availability, repulsion and/or adhesion signals [30]. In support of this possibility, we documented volume redistribution and topological closeness among supernumerary I7 and M72 glomeruli, as well as the local primary afferent reorganization in mice exposed chronically to cognate odorants. Complementary or alternatively,

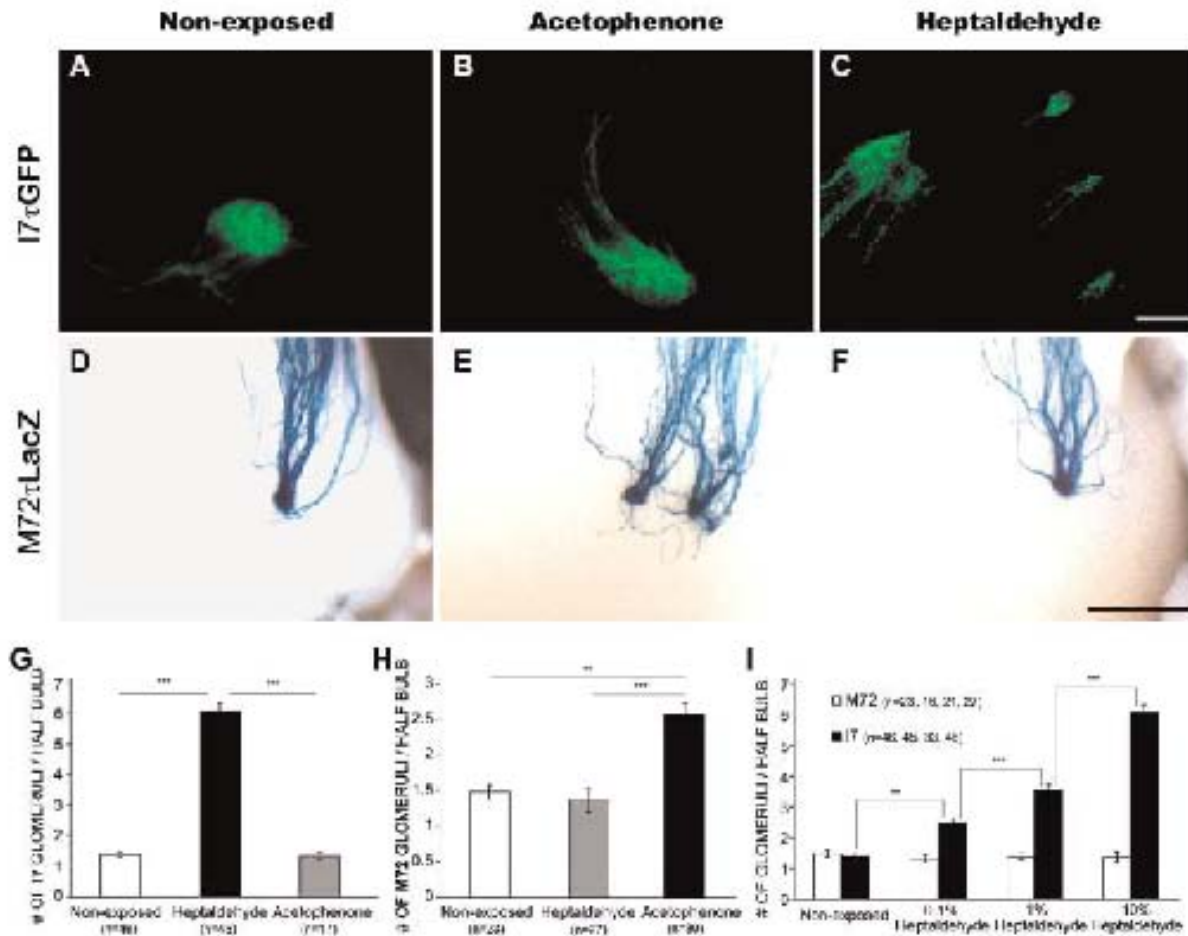


Figure 1. Chronic odorant exposure led to the dose-dependent and circuit-specific formation of supernumerary glomeruli. Figures A–C show representative I7::GFP glomeruli from non-exposed mice and from those exposed to pure acetophenone and 10% heptaldehyde, the latter being the cognate ligand. Figures D–F show representative M72::LacZ glomeruli from non-exposed mice and from those exposed to pure acetophenone and 10% heptaldehyde, the former being the cognate ligand. Scale bar, 100 μ m (I7::GFP) and 500 μ m (M72::LacZ). The bar graphs in G and H show the average number of I7 and M72 glomeruli per half bulb, respectively, for each condition. The bar graph in I depicts the average number of I7 and M72 glomeruli in response to different concentrations of heptaldehyde. Kruskal–Wallis sum rank test $p < 0.001$ followed by Dunn multiple comparison test; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0035558.g001

our results can also be attributed to modified patterns of spontaneous and/or increased or reduced presynaptic and/or postsynaptic neuronal activity [12,14,18,31–34], shifts in the availability of cAMP associated with OR activation [34–36], differential activation of G protein and/or adenylate cyclase [35–37] and/or changes in BDNF availability [14,38]. All the named factors are known to greatly influence the degree of glomerular axon coalescence and arborization, and glomeruli spatial distribution and number. The merit of these possibilities deserve consideration in future studies.

Unlike other similar studies that analyzed the effect of odorant exposure through the mother, during fetal and early postnatal stage [13,21], our study deals with the effect of mother independent odorant exposure or non-conditioned exposure [13]. The importance of this is in relation to the differing effects in glomerular number and size. Odorant exposure through the mother causes an increase in size of the activated glomeruli and accelerates their refinement [13,21], while our results show

a decrease in size and increase in number of the nominally activated glomeruli in response to chronic postnatal odorant exposure (see [39] for similar results for P2 glomeruli). The reasons for such a discrepancy are unclear. However, laboratory-to-laboratory differences in the number of P2 and M72 glomeruli in the olfactory bulb are commonly reported [12,37,40–44], a circumstance that has been suggested to be due to differences in the olfactory environment [39]. Thus, future studies must compare different protocols of odor exposure to evaluate differential plastic responses across the population of glomeruli, among other possibilities, as suggested by [21].

Traditionally, developmental neurobiologists have favored the selectionist view of the formation of neuronal circuits during brain development. There is evidence, however, supporting that many regions of the mammalian brain built up their circuits by adding new connectivity with little evidence of selection [17,45]. The olfactory bulb is not excluded from this debate. Although previous work has suggested that neuropil complexity within olfactory

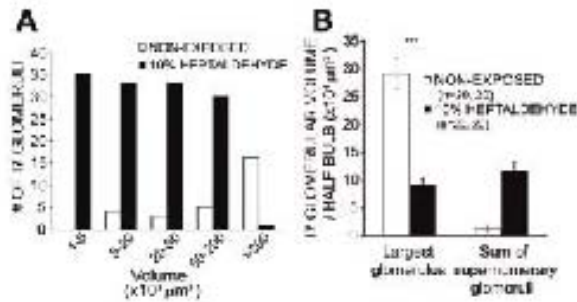


Figure 2. Chronic odorant exposure led to the redistribution of the glomerular volume. The graph in A shows a volume histogram of the total population of I7 glomeruli in 20 half bulbs of non-exposed mice and in those exposed to 10% heptaldehyde. The bar graph in B depicts the average volume of the largest I7 glomerulus per half bulb and the average sum of the volume of I7 supernumerary glomeruli per half bulb in non-exposed mice and in those exposed to 10% heptaldehyde. Kruskal-Wallis sum rank test: $p < 0.001$ followed by Dunn multiple comparison test: $***, P < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0085358.g002

glomeruli increases and the number of glomeruli continuously regresses as postnatal development proceeds [97], other cells pinpoint otherwise suggesting that olfactory glomeruli number decrease through fiber elimination or remodelling at a local level [12,13,92]. The present results indicate that during plastic responses to chronic odorant exposure, supernumerary glomeruli are added and consolidated as the olfactory bulb matures; no glomerular elimination was seen under any experimental condi-

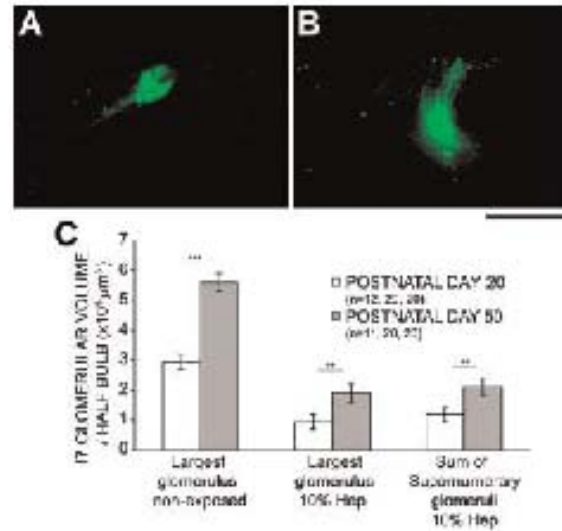


Figure 4. Supernumerary glomeruli grew in size after interrupting chronic odorant exposure. Figures A and B show representative I7-tdGFP supernumerary glomeruli at postnatal day (PD) 20 and at PD50, respectively, from 10% heptaldehyde exposed mice. Scale bar: 100 μm . Bar graph in C depicts the average I7 glomerular volume per half bulb, of the largest glomerulus in non-exposed mice, and the largest glomerulus and the sum of supernumerary glomeruli in mice exposed to 10% heptaldehyde (10% Hep). Non-paired t-test: $**$, $P < 0.01$; $***$, $P < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0085358.g004

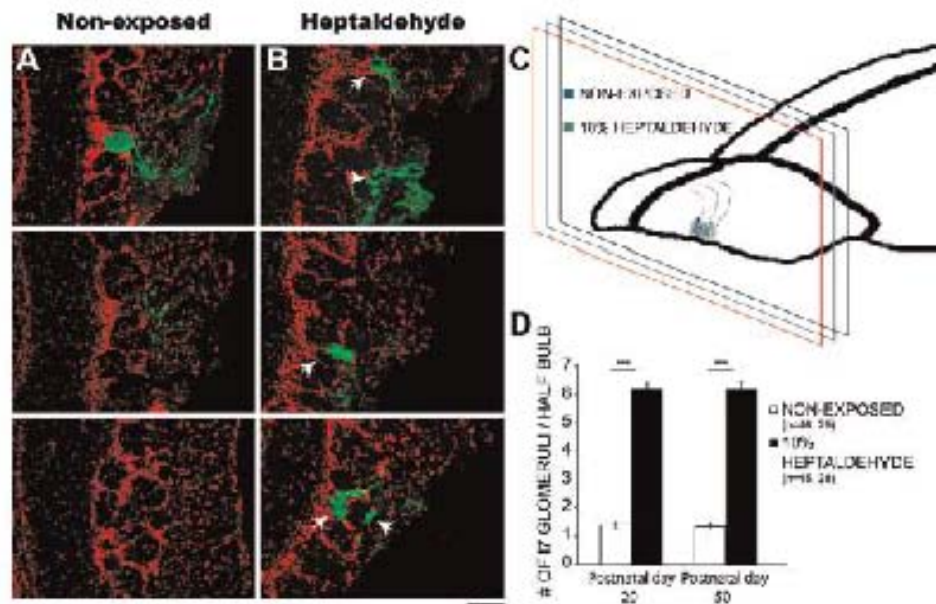


Figure 3. Supernumerary glomeruli persisted after interrupting chronic odorant exposure. Figures A and B show representative I7-tdGFP glomeruli (green) in coronal brain slices stained with DAPI (red) from non-exposed mice and from those exposed to 10% heptaldehyde and later raised without the odorant until postnatal day 50. Arrowheads indicate supernumerary glomeruli. Scale bar: 100 μm . Figure in C shows a schematic side view representation of the olfactory bulb, indicating the anterior ventrolateral position of I7 glomeruli in the coronal plane in non-exposed mice and in those exposed to 10% heptaldehyde, according to the location across brain slices. Bar graph in D shows the average number of I7 glomeruli per half bulb 30 days after the end of exposure. Kruskal-Wallis sum rank test: $p < 0.001$ followed by Dunn multiple comparison test: $***, P < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0085358.g003

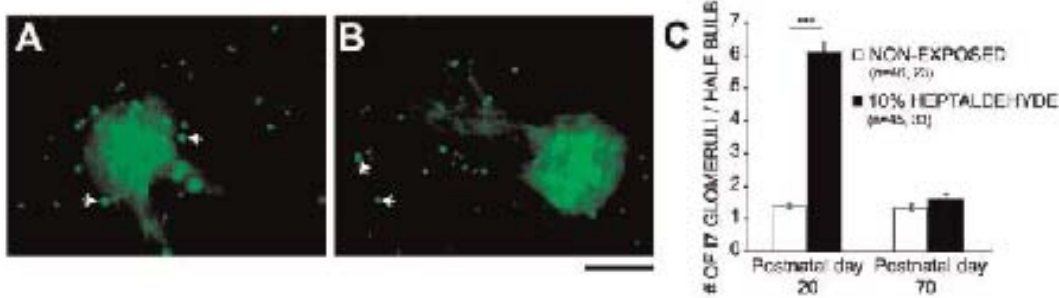


Figure 5. Adult mice were unable to form supernumerary glomeruli in response to chronic odorant exposure. Figures A and B show representative 17tauGFP glomeruli from non-exposed mice and from those exposed to 10% heptaldehyde, respectively; periglomerular neuron autofluorescence (arrows) is commonly seen in adults. Scale bar 100 μ m. The bar graph in C depicts the average number of 17 glomeruli per half bulb in mice exposed during early postnatal stage (PD0-PD20) and in those exposed during adulthood (PD50-PD70). Mann-Whitney U test ^{***}, $P < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0055358.g005

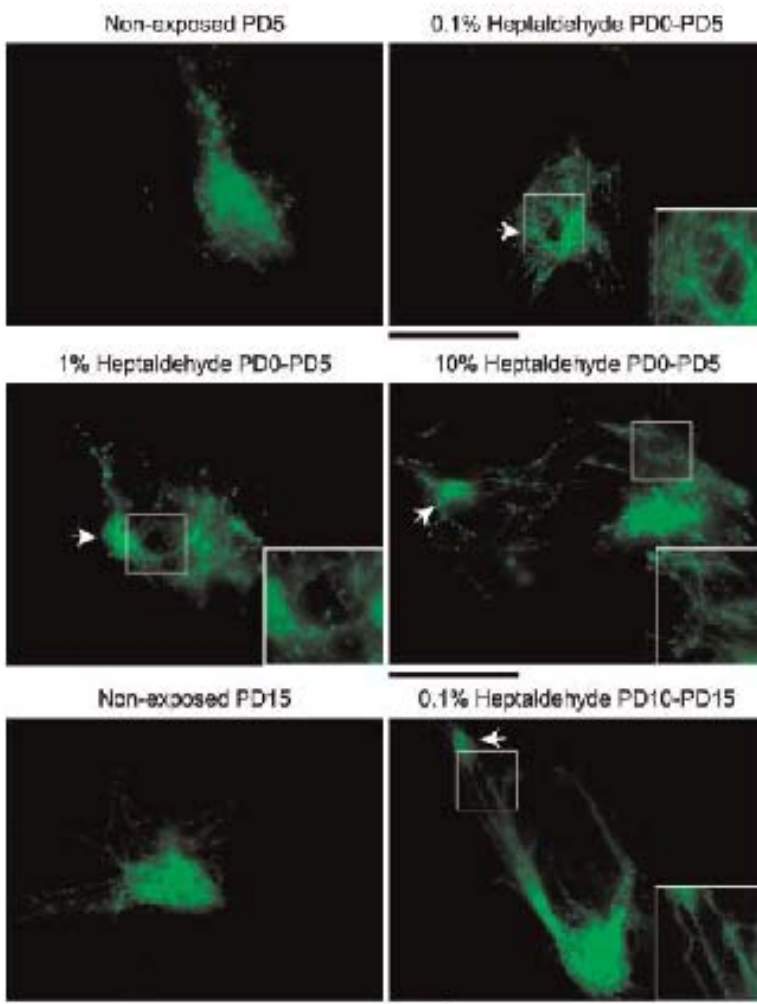


Figure 6. The largest glomeruli displayed primary afferent reorganization within a restricted space during chronic odorant exposure. The figure shows the expression of 17tauGFP glomeruli in non-exposed mice and mice exposed to heptaldehyde. Notice that primary afferents redistribute in variable ways between the largest and supernumerary glomeruli (arrows) in exposed mice. The effect was seen in all half bulbs analyzed (n = 10 for each condition) when mice were exposed from postnatal day (PD) 0 to PD5. In mice exposed from PD10 to PD15 the effect was seen in 8 out of 10 total half bulbs analyzed. Scale bar 100 μ m; inset square is 2 \times magnification. doi:10.1371/journal.pone.0055358.g006

tion (Figure 3 and S5). This result is compatible with the idea that at least under chronic odorant exposure before, during or after glomerular formation, the olfactory bulb uses a constructive strategy, both at the circuit and glomerular levels, to respond to increased sensory demands; however, this process did not involve an increase of total glomerular volume (Figure 2 and S4); also see [14,39]. In summary, the present results document a new strategy for the developing olfactory bulb to engage plastic responses.

Materials and Methods

Animals

I7-IRES-tau-GFP and M72-IRES-tau-LacZ knock-in mouse strains were generously gifted by Dr. Peter Mombaerts. Cross-breeding of both lines was made to obtain a double marked I7tauGFP/M72tauLacZ mouse strain in which all experiments were done. The expression of the axonal marker tau-green fluorescent protein and tau-beta-galactosidase are under the direct control of the endogenous OR promoter, for more details about the mice see [34,42]. Mice were maintained in a temperature controlled vivarium on a 12/12 light-dark cycle with food and water available *ad libitum*. For the experiments during adulthood, mice were weaned at 21 days of life. Animal procedures followed the National Institutes of Health (NIH) guidelines for the care and use of experimental animals (NIH approval number A5201-01). The protocols were revised and approved by the local animal rights committee at the Universidad Nacional Autónoma de México. Each experimental group came from at least two mouse litters and experiments were analyzed ideally by a single observer. All efforts were made to minimize the number of animals used and their potential suffering.

Chronic odorant exposure

I7tauGFP/M72tauLacZ mice were exposed to either heptaldehyde (80%; Sigma-Aldrich) or acetophenone (80%; J.T. Baker). Heptaldehyde and acetophenone are the cognate ligands of I7 and M72 ORs, respectively [24–26]. Pregnant female mice were housed in closed-top cages (1/cage), after pups were born, odorant stimulation was achieved at different postnatal stages. Each cage had a tight-sealed bottle from which the odorant was released via a filter paper; the bottle was inaccessible to mice. The odorant solution was changed daily to maintain proper concentration. To make odorant availability as equivalent as possible, we used heptaldehyde concentrated ten times lower than acetophenone because its vapor pressure is approximately ten times higher (Heptaldehyde: 3.65 mm/Hg; Acetophenone: 0.14 mm/Hg at 25°C). For acetophenone exposure, odorant was supplied from postnatal day (PD) 0, just after birth, to PD20 (50% concentrated). For heptaldehyde exposure, odorant was supplied to different animal groups from PD0 to PD20 (0.1, 1 and 10% concentrated), PD0 to PD5 (0.1, 1 and 10% concentrated), PD10 to PD15 (0.1% concentrated) and PD50 to PD70 (10% concentrated). Half of the mice that were exposed to 10% heptaldehyde from PD0 to PD20 were immediately sacrificed, and the other half were raised without the odorant until P1150, in different cages to prevent odorant contamination. In all of the experiments with heptaldehyde, pure DMSO (J.T. Baker) was used for diluting it. Mice from acetophenone, heptaldehyde and non-exposed groups were raised in different rooms in a vivarium with closed circuit ventilation systems to prevent cross effects.

Imaging of I7tauGFP glomeruli in fresh tissue

Mice were sacrificed by decapitation and olfactory bulbs were dissected. Then, the bulbs were mounted onto glass slides,

coverslipped and lathered (approximately 1.0 μm thick) to improve GFP visualization. Olfactory I7tauGFP glomeruli were identified by using epifluorescence and visualized through a Leica DM6000 vertical microscope. Images were captured (20X and 10X) and digitized with the software Leica LAS AF. The olfactory bulbs were imaged as early as 10 minutes and as late as 2 hours after sacrifice without apparent degeneration of the structures or decrease of the intensity of GFP fluorescence. Only glomeruli with undamaged axons were considered for analyses. The morphological parameters used to consider the observed structures as I7tauGFP glomeruli were them having a volume of at least 1000 μm^3 and inner fibers coalescing onto them. The search and counting of I7tauGFP glomeruli and the distance between them was done online in the microscope across all the visual field, structures smaller than 1000 μm^3 were excluded from the analysis offline after image exporting. Volume values were estimated offline in stacks (1 μm thick) using the ImageJ (NIH; Volume plugin [45]).

Imaging of I7tauGFP glomeruli with immunofluorescence

Mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital and perfused transcardially with PBS followed by freshly prepared 4% paraformaldehyde. After post-fixation for 3 hours, brains were cryoprotected in buffered sucrose (30%) for 2 days at 4°C. Brain slices (20 μm) were obtained with a cryostat. 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 1 hour. To label I7tauGFP positive structures, sections were incubated with a polyclonal goat anti-GFP antibody (Abcam, Cat. No. ab6573) at 1:1,000 dilution in blocking solution for 24 hours at 4°C. Then, sections were rinsed and incubated for 2 hours with a donkey anti goat-Abcam 600 secondary antibody (Invitrogen) and counterstained with DAPI. Slides were then coverslipped using DAPI. Immunofluorescence was achieved for non-exposed mice at PD50 and mice exposed to 10% heptaldehyde during PD0 to PD20 and raised until PD50. I7tauGFP immunofluorescent structures were visualized through a Leica DM6000 vertical microscope. Images were captured (20X) and digitized with the software Leica LAS AF, and used only for figure representation.

Imaging of M72tauLacZ glomeruli with X-gal staining

M72tauLacZ glomeruli were revealed in whole mounts [40]. Mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital and perfused transcardially with PBS followed by freshly prepared 4% paraformaldehyde. Whole mounts were prepared and the medial or the dorsal aspect of the olfactory bulb was imaged. To reveal β -galactosidase activity, the samples were incubated for 5 hours in a phosphate buffer containing 2 mM MgCl_2 , 0.01% sodium dextroxythiolate, 0.02% Nonidet P10, 5 mM potassium ferri-cyanide, 0 mM potassium ferrocyanide and 1 mg/ml of X-gal. Then the samples were washed thoroughly for 10 min in PBS and images of M72tauLacZ glomeruli were captured through a stereoscopic microscope Leica EZ4D. The parameter used to consider the observed structures as M72tauLacZ glomeruli was them having at least 5 visible fibers or one or more fiber bundles reaching them. The counting was done offline after image capture and digitization with Leica FireCam software.

Statistical analysis

Statistics were performed in GraphPad Prism 5. Quantitative data are presented as averages \pm standard errors. The statistical analysis was done by taking into account every half bulb

independently in all mice [12,13], because the probability of finding “n” number of glomeruli per half bulb varied equally between the half bulbs of the same mouse than between different mice. Analyses were performed blindly by a single observer.

Supporting Information

Figure S1 Mice at birth have 64% of their half bulbs with I7 glomeruli formed. Figures A and B show I7tauGFP positive axons and glomeruli, respectively, just after birth. Scale bar 100 μ m. We observed two different possibilities: half bulbs with locally dispersed I7tauGFP axons but with no coalescence (A), and half bulbs with a high degree of coalescence of I7tauGFP axons, forming glomeruli (B). We qualitatively separated both populations, and found that 22 of 34 half bulbs (64%) had one I7tauGFP protoglomerulus formed (C). (TIF)

Figure S2 Chronic odorant exposure after postnatal day (PD) 5 and PD10 led to the formation of supernumerary glomeruli. Figures A and B show I7tauGFP supernumerary glomeruli after exposure to 10% heptaldehyde (10% Hep). Scale bar 100 μ m. The bar graphs in C show the average number of I7 glomeruli per half bulb for each experimental condition. Kruskal-Wallis sum rank test: $p < 0.01$ followed by Dunn multiple comparison test: ***, $P < 0.001$. (TIF)

Figure S3 No refinement of I7 and M72 glomeruli was seen across postnatal development in a control olfactory

environment. The average number of I7 and M72 glomeruli per half bulb remained constant during early postnatal stage and adulthood in non-exposed mice. Kruskal-Wallis sum rank test: $p > 0.05$. (TIF)

Figure S4 Chronic odorant exposure did not led to increase of total glomerular volume. The bar graph shows total I7 glomerular volume per half bulb for non-exposed mice and mice exposed to heptaldehyde from postnatal day (PD) 0 to PD20. ANOVA: $p < 0.05$ followed by Dunnett multiple comparison test: *, $P < 0.05$. (TIF)

Acknowledgments

We especially want to thank Dr. Peter Mombaerts for the generous gifts of M72tauGFP and I7tauGFP mouse strains. We also want to thank Marcela Palermos and Diana Millán for their excellent technical assistance, and to the Doctorado en Ciencias Biomédicas (UNAM) for the academic support during the course of the present work. We are indebted to Claudia Rivera, head of the animal facility, for continuous advice, and the staff members of the Instituto de Fisiología Celular that helped to maintain the animals in optimal conditions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PV-I, ER-H, GG-O, RV. Performed the experiments: PV-I. Analyzed the data: PV-I, ER-H. Contributed reagents/materials/analysis tools: RV, RD-C. Wrote the paper: PV-I, RV, GG-O.

References

- Hubel DH, Wiesel TN (1970) The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol* 206: 419–56.
- Shatz CJ, Stricker MP (1978) Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex and the effects of monocular deprivation. *J Physiol* 301: 967–93.
- LeVay S, Wiesel TN, Hubel DH (1980) The development of ocular dominance columns in normal and visually deprived monkeys. *J Comp Neurol* 191: 1–51.
- Schwartz RF, Sapiro G, Singer W, Olsh A (2002) Spatial analysis of ocular dominance patterns in monocularly deprived cats. *Cereb Cortex* 12: 788–96.
- Grubb MS, Thompson ID (2004) The influence of early experience on the development of sensory systems. *Curr Opin Neurobiol* 14: 93–99.
- Akono M, Viollet C, Gabellec MM, Mesa-Yedid V, Clivio-Marin JC, et al. (2006) Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 26: 10500–05.
- Chen KL, Colclough J, Barak O (2008) Gating in vivo experience triggers synaptic metaplasticity in the neocortex. *Science* 319: 101–4.
- Durfield D, Hara K (2009) Metaplasticity governs natural experience-driven plasticity of nociceptive embryonic brain circuits. *Neuron* 64: 940–50.
- Di Marco S, Nguyen VA, Eick S, Frost DM (2009) Permanent functional reorganization of retinal circuits induced by early long-term visual deprivation. *J Neurosci* 29: 10691–99.
- Cao D, Zhao X, Gheisla DC (2011) Functional refinement in the projections from ventral cochlear nucleus to lateral superior olive precedes hearing onset in rat. *PLoS One* 6: e28076.
- Carrazco MM, Mao YT, Balmer TS, Pallas SL (2011) Inhibitory plasticity underlies visual deprivation-induced loss of receptive field refinement in the adult superior colliculus. *Bar J Neurosci* 33: 58–65.
- Zou YJ, Feinstein P, Rivers AJ, Mombaerts G, Kim A, et al. (2004) Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Sensory* 304: 1976–9.
- Kerr MA, Belkacem L (2006) Olfactory experience accelerates glomerular refinement in the mammalian olfactory bulb. *Nat Neurosci* 9: 404–6.
- Oliva AM, Jones KR, Renucci D (2008) Sensory-dependent asymmetry for a urine responsive olfactory bulb glomerulus. *J Comp Neurol* 510: 171–81.
- Maher BJ, McKinley MJ, Westbrook GL (2009) Experience-dependent maturation of the glomerular microcircuit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 16850–55.
- Cummings DM, Belkacem L (2010) Continuous neural plasticity in the olfactory intrabulbar circuitry. *J Neurosci* 30: 9172–80.
- Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274: 1133–8.
- Yu CR, Power J, Benes G, O'Donnell S, Brown HE, et al. (2011) Spontaneous neuronal activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron* 69: 353–66.
- Beller MB (2009) Retinal waves are likely to instruct the formation of eye-specific retinogeniculate projections. *Neural Dev* 4: 24.
- Xu HP, Freeman M, Mirens VS, Chen H, King SJ, et al. (2011) An instructive role for patterned spontaneous neural activity in mouse visual map development. *Neuron* 70: 1115–27.
- Todorok J, Herb G, Renucci D (2011) Effect of in utero odorant exposure on neuroanatomical development of the olfactory bulb and odour preferences. *Proc Biol Sci* 278: 1949–55.
- Mombaerts P (2006) Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 415–59.
- Araneda RC, Kim AD, Ferozian S (2008) The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nat Neurosci* 11: 1248–55.
- Rezza T, Feinstein P, Zheng C, Mombaerts P (2007) Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *J Neurosci* 27: 9033–43.
- Nguyen MQ, Zhou Z, Marks CA, Ryba NJ, Belkacem L (2007) Prominent roles for odorant receptor coding sequences in allele exclusion. *Cell* 131: 1006–17.
- Tao J, Sauvage A, Ma M, Luo M (2010) Olfactin information processing by the olfactory bulb analyzed in gene targeted mice. *Neuron* 65: 512–26.
- Tomeroy SJ, LaManna AS, Purves D (1990) Postnatal construction of neural circuitry in the mouse olfactory bulb. *J Neurosci* 10: 1952–66.
- Poner SM, Zheng C, Kim DS, Feinstein P, Fraser SB, et al. (2001) Structure and emergence of specific olfactory glomeruli in the mouse. *J Neurosci* 21: 9175–95.
- Nguyen-Ba-Chauvet KT, Di Meglio J, Vaquer C, Chédotal A (2008) Robo and Slit control the pathfinding and targeting of mouse olfactory sensory neurons. *J Neurosci* 28: 4944–49.
- Senizawa S, Miyamichi K, Takahashi H, Yamagishi Y, Suzuki M, et al. (2008) A neuronal identity code for the odorant receptor specific and activity dependent axon sorting. *Cell* 132: 808–19.
- O'Rourke NA, Clune HT, Fraser SE (1994) Rapid remodeling of axonal arbors in the brain with and without blockade of synaptic transmission. *Neuron* 12: 921–31.
- Nicotani D, Senizawa S, Nakajima M, Iino T, Sakano H (2010) Developmental elimination of axonal projections from the transgenic OR gene that has lost zone specificity in the olfactory epithelium. *Eur J Neurosci* 18: 2:21–32.
- Ruthazer ES, Azerman CJ, Clune HT (2005) Control of axon branch dynamics by correlated activity in vivo. *Science* 309: 166–69.
- Mulley AS, Miller AM, Araneda RC, Maurer LR, Miller F, et al. (2010) Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated channels in olfactory sensory neurons regulate axon extension and glomerular formation. *J Neurosci* 30: 16498–508.

35. Intal T, Suzuki M, Sakino H (2006) Odorant receptor derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science* 314: 612–616.
36. Chedier A, Zou YJ, Le Pichen G, Ferafin ZA, Marthens GA, et al. (2007) A G-protein/cAMP signal cascade is required for axonal convergence into olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1039–44.
37. Biju KG, Mista DR, Man TG, Padool DA (2008) Deletion of voltage-gated channel affects glomerular refinement and odorant receptor expression in the mouse olfactory system. *J Comp Neurol* 510: 161–79.
38. Cho I, Dhali A, Mizui J, Bhowmik R, Laccavino G, et al. (2007) Genetic modulation of BDNF signaling affects the outcome of axonal competition *in vivo*. *J Neurosci* 27: 7084–7091.
39. Olfen AM, Salcedo E, Heller JL, Ly X, Koka R, et al. (2010) Toward a mouse neuroethology in the laboratory environment. *PloS One* 5: e11339.
40. Mombaert F, Wang F, Duke G, Chan SK, Nemes A, et al. (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87: 417–49.
41. Royal SJ, Key B (1993) Development of P2 olfactory glomeruli in P2 litteral ribosome entry site-*lacZ* transgenic mice. *J Neurosci* 13: 9056–64.
42. Zheng G, Bergman P, Bezza T, Rodriguez J, Mombaert F (2002) Peripheral olfactory projections are differentially affected in mice deficient in a cyclic nucleotide-gated channel subunit. *Neuron* 36: 81–91.
43. Liu DM, Wang F, Lowe G, Gold GH, Axel R, et al. (2000) Formation of precise connections in the olfactory bulb occurs in the absence of odorant-evoked neuronal activity. *Neuron* 26: 49–60.
44. Scheerer MI, Finger TE, Restrepo D (2001) Variability of position of the P2 glomerulus within a map of the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 436: 351–62.
45. Quartz SR, Sejnowski TJ (1997) The neural basis of cognitive development: a connectionist model. *Behav Brain Sci* 20: 537–56.
46. Merain M (2008) Applying stereological method in radiology: Volume measurement. Bachelor's thesis, University of Trier.