



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**PREVENCIÓN DE LOS EFECTOS DEL PÉPTIDO  $\beta$ -AMILOIDE *IN VITRO* POR EL  
ENRIQUECIMIENTO SENSORIAL**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

**ANA KAREN PIMENTEL FARFÁN  
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR**

**DRA. WENDY PORTILLO MARTÍNEZ  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA**

**JURIQUILLA, MÉXICO AGOSTO 2016**



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Ana Karen Pimentel Farfán, cuyo título es: “**PREVENCIÓN DE LOS EFECTOS DEL PÉPTIDO  $\beta$ -AMILOIDE IN VITRO POR EL ENRIQUECIMIENTO SENSORIAL**” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente  
Dra. Stéphanie Thebault

---

Secretario  
Dr. José Fernando Peña Ortega

---

Vocal  
Dr. María Rosa Ávila Costa

---

Suplente  
Dr. Octavio García González

---

Suplente  
Dr. Pavel Rueda Orozco

---

Aprobado por el Comité Académico

---

Coordinadora del Programa  
Dra. Maricela Luna Muñoz

Esta tesis y el trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio C-01 del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México supervisado por el Dr. José Fernando Peña Ortega con el financiamiento de CONACyT con los proyectos No. 117, 235789, 237570, 246888 y 181323, de la DGAPA-UNAM con el proyecto No. IN200715 y de la Cátedra Marcos Moshinsky.

## **Agradecimientos institucionales**

A la

**Universidad Nacional Autónoma de México**

Y al

**Instituto de Neurobiología**

Que facilitaron las instalaciones para llevar a cabo la maestría y mi proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado estos dos años (Becaria No. 619506).

Al Dr. Fernando Peña Ortega por dejarme ser parte de su grupo de investigación, por estar disponible en cada momento que solicité su apoyo para resolver dudas académicas, metodológicas y sobre todo por gran dedicación para revisar mi escrito.

A los miembros del comité tutor, la Dra. Wendy Portillo y el Dr. Octavio César García González, por su tiempo y aportaciones al proyecto cada semestre.

A los integrantes del jurado de examen la Dra. Stéphanie Thebault, la Dra. Rosa María de Lourdes Ávila Costa y el Dr. Pavel Rueda Orozco quienes dieron lectura a la tesis y con sus aportaciones ayudaron a que mejorara y a que aprendiera más.

Al personal docente y académico que contribuyó a mi formación académica durante las clases y las prácticas en la maestría.

Al Dr. Benito Ordaz por su apoyo técnico.

A todos los integrantes del laboratorio C-01 que estuvieron y que están, José María, Arturo, Jonathan, Lupita, Anita, Karla, Josué, Kenia, Rebeca, Polet, Benjamín, Keila, Ernesto, David, Andrés, Eduardo, Martín, Fernanda.

Al responsable del bioterio, MVZ José Martín García Servín. A los trabajadores del mismo, encargados de mantener a los animales en óptimas condiciones, en especial a la Dra. Alejandra Castilla León por su amabilidad y su atención, siempre profesional.

A la Dra. Daisy Gasca responsable de las instalaciones de análisis conductual. Al Dr. Juan Riesgo, al Dr. Rogelio Arellano y al Dr. Ataúlfo Martínez por permitir amablemente el uso de los cuartos para pruebas conductuales.

A Lourdes Lara encargada de las aulas de Videoconferencia por su apoyo durante las clases y los exámenes tutoriales.

A Guadalupe Amador Uribe responsable de Servicios Escolares de maestría, por su cordialidad y amabilidad para atender a las dudas administrativas que nos aquejan.

Finalmente a la M. en C. Leonor Casanova Rico de la Unidad de enseñanza por su disponibilidad, su atención, su eficiencia y su apoyo ante cualquier necesidad y duda administrativa.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a esas personas que siempre han estado conmigo y que me han acompañado, así como a las maravillosas personas que conocí en la maestría.

Primero, deseo agradecer a mi mamá Hilda y a mis hermanos Álvaro y Abraham, que son un pilar en mi vida.

A mi abuela Adelaida, a mis tías Lilia, Anabel e Irma que siempre están ahí y en especial a mi tía Griselda por estar pendiente y no dejar que desaparezca.

A José María por haberme cambiado la vida y por haberme impulsado para estar aquí.

A mis compañeritos de la maestría, en especial a quienes en algún momento nos hicimos cercanos Mayra, Maricarmen, Zeus, Víctor, Rubén y Vicente.

A Rubén y Vicente por ser como son, porque definitivamente no es el lugar, es la compañía.

A mis amigos de la vida que seguimos siendo parte uno del otro Paola, Alberto, José Manuel y Jair. Y por supuesto a María Fernanda por ser grandiosa y haberse convertido en alguien tan importante para mí, que me acompañó en muchos momentos difíciles durante estos dos años.

Finalmente a Vicente, por acompañarme, ayudarme a aprender de mí y hacerme mejor.

## Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más común entre las personas mayores de 65 años. La progresión de la EA involucra diferentes etapas que eventualmente derivan en la neurodegeneración de distintas estructuras del sistema nervioso central (SNC). Estudios longitudinales han identificado una disfunción olfatoria temprana en individuos vulnerables para desarrollar EA, misma que correlaciona con el deterioro cognitivo. Ambos procesos patológicos parecen ser consecuencia, inicialmente, de la sobreproducción del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) y de su efecto patológico sobre la actividad de varios circuitos neuronales, incluido el bulbo olfatorio (BO). La búsqueda de terapias no farmacológicas que favorezcan la actividad del circuito del BO nos ha llevado a evaluar si el enriquecimiento olfatorio (EO) actúa de forma preventiva contra el efecto inhibitorio del  $\beta$ A sobre la actividad espontánea de esta red neuronal. Para cumplir este objetivo, se utilizaron ratones expuestos a EO durante 21 días a los que se les evaluó la olfacción y la actividad espontánea de las neuronas granulares (Gr) del BO, así como su sensibilidad a la aplicación de  $\beta$ A. Nuestros resultados muestran que el EO mejora la identificación de un aroma biológicamente relevante, sin modificar la actividad espontánea de las Gr del BO *in vitro*. Además, se mostró que el EO evita el efecto inhibitorio que causa el  $\beta$ A en la actividad del BO. El resultado de que el EO previene los efectos deletéreos producidos por el  $\beta$ A sugiere que el EO podría ser utilizado para la prevención de la EA.

## **Abstract**

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent dementia among people over 65 years. AD progression involves different stages which eventually lead to the neurodegeneration of different structures in the central nervous system. Longitudinal studies have identified early olfactory dysfunction among people vulnerable to develop AD. This olfactory dysfunction correlates with the cognitive impairment. Both, early olfactory dysfunction and cognitive impairment are triggered by amyloid-beta peptide ( $A\beta$ ) overproduction and its pathological effects on the activity of several neuronal circuits, including the olfactory bulb (OB). By seeking non-pharmacological therapies to promote the activity of the OB circuit, we tested whether olfactory enrichment (OE) could prevent the  $A\beta$ -induced inhibitory effect on the spontaneous activity of this circuit. Thus, mice were exposed to OE for 21 days before testing their olfactory capabilities, the spontaneous activity of the OB granular cells (Gr) and its sensitivity to  $A\beta$  application. Our data shows that OE improves the identification of a biologically relevant odor without modifying OB Gr spontaneous activity. Also, we found that OE prevents the  $A\beta$ -induced inhibition of OB activity, which suggests that OE could be a preventive strategy to avoid AD-related symptoms.

## Lista de abreviaturas

2-DG	2, desoxi-D-glucosa
BO	Bulbo olfatorio
CAc	Células de axón corto
CE	Corteza entorrinal
DA	Dopamina
DCL	Deterioro cognitivo leve
EA	Enfermedad de Alzheimer
EO	Enriquecimiento olfatorio
FNDC	Factor neurotrófico derivado del cerebro
GABA	Ácido gamma amino butírico
Gr	Células granulares
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
LCE	Líquido cerebroespinal
M/E	Células mitrales y empenachadas
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Neurona olfatoria sensorial
PG	Células periglomerulares
PLC	Potenciales locales de campo
PLP	Potenciación a largo plazo
pM	Picomolar
PPA	Proteína precursora del amiloide
QGS3 $\beta$	Quinasa de la glucógeno sintasa 3 $\beta$
SNC	Sistema nervioso central
TMT	2,4,5-trimetiltiazol
TOL	Tracto olfatorio lateral
$\beta$ A	Péptido beta amiloide

# Índice general

<b>Resumen</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>ix</b>
<b>Índice general</b>	<b>x</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>12</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>13</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>14</b>
2.1. <i>La enfermedad de Alzheimer</i>	14
2.1.1. Etapas de la enfermedad de Alzheimer	15
2.1.2. La pérdida de la olfacción durante la enfermedad de Alzheimer	17
2.1.3. El péptido $\beta$ amiloide	19
2.1.4. Funciones fisiológicas del péptido $\beta$ A	20
2.1.5. Efecto patológico del péptido $\beta$ A	20
2.1.6. Deterioro olfatorio en los modelos animales de la enfermedad de Alzheimer	22
2.2. <i>Fisiología del bulbo olfatorio</i>	24
2.2.1. Propiedades electrofisiológicas del bulbo olfatorio	27
2.2.2. Cambios electrofisiológicos en el bulbo en modelos de la enfermedad de Alzheimer	30
2.2.3. El enriquecimiento olfatorio	30
<b>3. Justificación</b>	<b>33</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>34</b>
<b>5. Objetivo general</b>	<b>34</b>
5.1. <i>Objetivos específicos</i>	34
<b>6. Materiales y métodos</b>	<b>34</b>
6.1. Animales	34
6.2. Enriquecimiento olfatorio	35
6.3. Prueba de habituación-deshabitación	35
6.4. Prueba de evitación olfatoria	36
6.5. Obtención de rebanadas de bulbo olfatorio	37
6.6. Registros de potenciales locales de campo	37
6.7. Oligmerización del péptido $\beta$ A	38
6.8. Análisis de resultados	39

6.8.1. Evaluaciones conductuales	39
6.8.2. Registros electrofisiológicos	39
<b>7. Resultados</b>	<b>41</b>
<i>7.1. Evaluación de la actividad espontánea y del efecto del péptido <math>\beta A</math> en rebanadas de bulbo olfatorio animales jóvenes</i>	<i>41</i>
7.1.1. Evaluación de la viabilidad funcional de rebanadas de bulbo olfatorio de ratones jóvenes	41
7.1.2. Efecto del $\beta A_{1-42}$ en el bulbo olfatorio del ratón joven	42
7.1.3. Efecto del enriquecimiento olfatorio en la actividad espontánea del bulbo olfatorio de animales jóvenes	43
7.1.4. Efecto del $\beta A_{1-42}$ en el bulbo olfatorio del ratón joven enriquecido	44
<i>7.2. Evaluación de la actividad espontánea y el efecto del péptido <math>\beta A</math> en rebanadas de animales adultos</i>	<i>46</i>
7.2.1. Evaluación de la viabilidad funcional de rebanadas de bulbo olfatorio de animales adultos	46
7.2.2. Efecto del enriquecimiento olfatorio en la actividad espontánea del bulbo olfatorio del ratón adulto <i>in vitro</i>	47
7.2.3. Efecto del $\beta A_{1-42}$ en el bulbo olfatorio del ratón adulto	48
7.2.4. Efecto del $\beta A_{1-42}$ en el bulbo olfatorio del ratón adulto enriquecido	49
<i>7.3. Evaluación de la actividad espontánea del bulbo olfatorio con respecto a la edad</i>	<i>50</i>
<i>7.4. Evaluación de la capacidad olfatoria</i>	<i>51</i>
7.4.1. Evaluación olfatoria en animales enriquecidos: habituación- deshabituación	51
7.4.2. Evaluación olfatoria en animales enriquecidos: evitación olfatoria	51
<b>8. Discusión</b>	<b>54</b>
<b>9. Consideraciones finales</b>	<b>61</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>62</b>
<b>Referencias</b>	<b>63</b>

## Índice de figuras

Figura 1 Modelo de agregación del péptido $\beta$ A	21
Figura 2 Anatomía comparada del bulbo olfatorio de la rata y del humano	25
Figura 3 Circuitería del bulbo olfatorio	27
Figura 4 Vías paralelas de proyección de las neuronas principales del bulbo olfatorio y sus diferentes blancos hacia la corteza	28
Figura 5 La actividad espontánea de la capa granular del bulbo olfatorio de animales jóvenes es estable a lo largo del protocolo de experimentación	41
Figura 6 El péptido $\beta$ A disminuye la actividad espontánea de la capa granular del bulbo olfatorio	43
Figura 7 El enriquecimiento olfatorio no modifica la actividad espontánea de las neuronas granulares del bulbo olfatorio en animales jóvenes	44
Figura 8 El enriquecimiento olfatorio evita la inhibición de la actividad espontánea de la capa granular de rebanadas de bulbo olfatorio producida por el $\beta$ A <sub>1-42</sub>	45
Figura 9 La actividad espontánea de la capa granular del bulbo olfatorio de animales adultos es estable a lo largo del protocolo de experimentación	46
Figura 10 El enriquecimiento olfatorio no modifica la potencia ni los componentes de frecuencia de la actividad espontánea de las neuronas granulares del bulbo olfatorio	47
Figura 11 El $\beta$ A <sub>1-42</sub> péptido inhibe la actividad espontánea de las neuronas granulares del bulbo olfatorio de animal adulto	48
Figura 12 El enriquecimiento olfatorio evita la inhibición de la actividad espontánea de las neuronas granulares del bulbo olfatorio inducida por el $\beta$ A <sub>1-42</sub>	49
Figura 13 La actividad basal del bulbo olfatorio no se modifica con la edad	50
Figura 14 El enriquecimiento no modifica la detección de olores neutros	51
Figura 15 Los animales enriquecidos desempeñan mejor una tarea de evitación olfatoria	53

## 1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología crónica, neurodegenerativa e irreversible (Hampel, 2013), cuyo síntoma principal es la pérdida de la memoria. Esta enfermedad es el tipo de demencia más común entre las personas mayores de 65 años; se calcula que actualmente, 46 millones de personas viven con demencia (Prince et al., 2015), esta cifra representa el 6 % de la población mundial. Su prevención y tratamiento oportuno son fundamentales para mejorar la calidad de vida de los adultos mayores y, para ello, es elemental entender los mecanismos celulares que subyacen a la afectación de los circuitos neuronales que repercuten en la manifestación conductual y cognitiva de la enfermedad (Peña-Ortega, 2013).

Conforme progresa la EA se han identificado diferentes fases donde los distintos síntomas aparecen y/o se agravan. De manera sobresaliente, la hipofunción olfatoria se ha observado en la fase *predemencial* de la EA (Hawkes & Doty, 2009) y se manifiesta antes de la afectación de la memoria, síntoma principal para el diagnóstico de la EA. El deterioro olfatorio está asociado a distintas patologías que cursan con demencia (Hawkes & Doty, 2009) y, en la EA, el deterioro olfatorio puede predecir el desarrollo de muchos de sus síntomas (Bahar-Fuchs, Moss, Rowe, & Savage, 2010; Hawkes & Doty, 2009; Masurkar & Devanand, 2014). En esta tesis nos propusimos explorar estrategias terapéuticas no farmacológicas que favorezcan la actividad del bulbo olfatorio (BO) y, posiblemente, eviten su deterioro ante la exposición al péptido amiloide ( $\beta$ A; Alvarado-Martínez, Salgado-Puga, & Peña-Ortega, 2013).

La propuesta anterior se basa en que la estimulación sensorial y motora, provocada por el enriquecimiento ambiental, ha demostrado ser una estrategia prometedora para retrasar y/o reducir los efectos dañinos asociados a la EA cuando éstos son estudiados en modelos animales (Catlow et al., 2009; Chuang, 2010; Lazarov et al., 2005; Valero et al., 2011). En este sentido, la estimulación olfatoria ha sido catalogada como una estrategia que permite el refinamiento del circuito del BO (Breton-Provencher & Saghatelian, 2012; Livneh, Adam, & Mizrahi, 2014). Además la estimulación olfatoria cambia la fisiología del BO desde el nivel molecular (Coopersmith, Henderson, & Leon, 1986; Coopersmith et al., 1986; Woo, Coopersmith, & Leon, Michael, 1987), el electrofisiológico (Livneh et al., 2014; Martin, Beshel, & Kay, 2007) y el conductual (Mandairon, Didier, & Linster, 2008; Mandairon, Stack, & Linster, 2006). Es por ello que se decidió probar si el enriquecimiento olfatorio (EO) podría generar un “estado protector” y

reducir el efecto inhibitorio del péptido  $\beta$ A ( $\beta$ -amiloide) en la actividad espontánea de las neuronas Gr de la capa granular del BO, cuya sensibilidad al  $\beta$ A *in vitro* ha sido reportada por nuestro propio laboratorio (Alvarado- Martínez, 2012; Alvarado-Martínez et al., 2013).

## 2. Antecedentes

### 2.1. La enfermedad de Alzheimer

La EA fue descrita en 1906 por el Dr. Alois Alzheimer (Morris & Salmon, 2007; Wolfe, 2002), quien describió las características clínicas de un tipo de demencia senil que después recibió su nombre. La EA es caracterizada por la disminución progresiva de múltiples funciones corticales superiores y está asociada con dos marcadores histopatológicos detectados clásicamente *post mortem*: las marañas neurofibrilares y las placas seniles (Wolfe, 2002). Sin embargo, correlatos de ambos marcadores ya pueden detectarse con tomografía por emisión de positrones (Mueller et al., 2005; Nyberg et al., 2009; Shin, Lee, Kim, Kim, & Cho, 2008). Las marañas neurofibrilares y las placas seniles se encuentran en áreas específicas del cerebro como la corteza entorrinal (CE), la formación hipocampal, la amígdala, y la neocorteza (Braak & Braak, 1991; Reitz, Brayne, & Mayeux, 2011; Selkoe, 2000). Actualmente, se define a la EA como una enfermedad crónica, neurodegenerativa e irreversible caracterizada por pérdida de la memoria y la alteración de los procesos cognitivos (Morris & Salmon, 2007; Small, Herlitz, & Bäckman, 1998). La EA representa la demencia más común entre la población adulta mayor (Reitz et al., 2011). Se estima que en México más de 350 mil personas padecen EA (Secretaría de Salud, 2015). La incidencia de esta patología en México, y en otros países, incrementa en función de la edad, pues el 10% de las personas con 65 años y el 47% de las personas con 85 años son diagnosticados con esta enfermedad (Secretaría de Salud, 2015; Weuve, Proust-Lima, et al., 2015; Weuve, Hebert, Scherr, & Evans, 2015).

La identificación de la demencia tipo EA se realiza con pruebas neuropsicológicas (como el examen de estado mini-mental, la prueba de orientación-memoria-concentración de Blessed, la escala de calificación de la demencia de Mattis, entre otras) (Small et al., 1998), a partir de las cuales se ha categorizado a la enfermedad en 3 etapas progresivas (Bäckman, Jones, Berger, Laukka, & Small, 2004), mismas que se describirán brevemente a continuación.

### **2.1.1. Etapas de la enfermedad de Alzheimer**

El deterioro cognitivo leve (DCL) o etapa *predemencial* de la EA (Braak & Braak, 1991; Helmes & Østbye, 2002; McKhann et al., 1984; Small et al., 1998), es un estado transicional entre el envejecimiento no patológico y la demencia muy temprana, que se ha reconocido como un factor de riesgo para la EA (Nelson et al., 2012). El DCL se caracteriza por lapsos de pérdida de memoria declarativa y semántica, que se pueden acompañar de deterioro de otros procesos cognitivos como la atención y el desempeño bajo en tareas de memoria (Alegret et al., 2014; Bäckman et al., 2004; Levey, Lah, Goldstein, Steenland, & Bliwise, 2006). Se ha corroborado que la proporción de pacientes diagnosticados con DCL, particularmente de tipo amnésico, que desarrolla EA es de entre 10 y 38% (Babizhayev, Deyev, & Yegorov, 2011; Maioli et al., 2007; Reitz et al., 2011).

En la *etapa temprana* de la EA se presentan episodios amnésicos que afectan varios tipos memoria como es la memoria de corto plazo (Bäckman et al., 2004; Small et al., 1998), la memoria episódica, sobre todo en su capacidad retrógrada (Förstl & Kurz, 1999), la memoria de trabajo (Förstl & Kurz, 1999). Además, estas alteraciones de memoria se acompañan del deterioro progresivo de funciones cognitivas específicas como el lenguaje (afasia), las habilidades motoras (apraxia) y el reconocimiento de objetos (agnosia) (Förstl & Kurz, 1999; McKhann et al., 1984). La agnosia se considera una afectación de la percepción sensorial, particularmente visual, que no puede atribuirse solamente a deficiencias de tipo sensorial (Förstl & Kurz, 1999; McKhann et al., 1984). La afasia se manifiesta como una alteración en la fluidez verbal del tipo categórico o semántico y la apraxia como la deficiencia en la ejecución motora fina (copiar dibujos) (Förstl & Kurz, 1999; McKhann et al., 1984). En la *etapa moderada* de la EA, los pacientes se vuelven menos independientes, se agravan los problemas de lenguaje, comienzan a mostrar problemas con la memoria de largo plazo. Además, estos síntomas se acompañan de discalculia (defecto en la lectura, escritura y comprensión de los números) y dificultad para realizar tareas complejas (Förstl & Kurz, 1999). En esta fase de la EA se observan cambios de la personalidad y trastornos conductuales (Gracey & Morris, 2007). La última etapa de la EA es la *etapa avanzada*, en la que el paciente exhibe un deterioro cognitivo severo y pierde definitivamente su capacidad de responder al ambiente (Förstl & Kurz, 1999; Gracey & Morris, 2007). Se ha encontrado que en esta etapa los pacientes presentan un perfil neuropsicológico conocido como la triada afasia-apraxia-agnosia, es decir que, el daño cognitivo coexiste con

deterioro en el lenguaje, la actividad motora y la percepción sensorial (Gracey & Morris, 2007; Helmes & Østbye, 2002). En este estadio, el paciente con EA avanzada es incapaz de cuidarse a sí mismo (Helmes & Østbye, 2002; Nelson et al., 2012).

Se ha identificado que las personas con EA presentan deterioro en el olfato, que puede exhibirse como la reducción parcial (hiposmia) o la pérdida completa del olfato (anosmia) (Hawkes & Doty, 2009; Stamps, Bartoshuk, & Heilman, 2013; Warner, Peabody, Flattery, & Tinklenberg, 1986). De hecho, se ha identificado de la hipofunción olfatoria es un buen predictor de patologías neurodegenerativas, incluida la EA, y que se agrava proporcionalmente al daño cognitivo del paciente, en el caso de la EA (Hawkes & Doty, 2009). Más adelante, se ahondará acerca de la olfacción y su relación con la EA.

La EA se ha clasificado en dos grandes grupos, el primero es de origen genético y representa menos del 5 % de los casos (Reitz et al., 2011). Este subgrupo de la EA, llamado EA familiar, se caracteriza por iniciar a edad temprana, entre los 40 y los 50 años de edad, así como por progresar muy rápidamente, comparada con la EA esporádica (de origen no-genético) (Reitz et al., 2011). La EA esporádica constituye aproximadamente al 95 % de los casos y se presenta a partir de los 65 años de edad (Reitz et al., 2011). La EA de origen genético está asociada a mutaciones de los genes que codifican para la proteína precursora del amiloide (PPA), así como mutaciones en proteínas asociadas al complejo  $\gamma$ -secretasa, como la presenilina 1 y la presenilina 2 (Selkoe, 2000). Todas estas mutaciones incrementan la producción del péptido  $\beta$ A (Selkoe, 2000).

Como ya se mencionó, los dos marcadores histopatológicos por excelencia de la EA son las marañas neurofibrilares y las placas amiloideas (Beer & Ulrich, 1993; Braak & Braak, 1991; Förstl & Kurz, 1999; Morris & Salmon, 2007), que se identifican *post-mortem* en el cerebro de los pacientes (Braak & Braak, 1991), pero cuyos correlatos ya pueden detectarse *in vivo* con tomografía por emisión de positrones (Mueller et al., 2005; Nyberg et al., 2009; Shin et al., 2008). Las marañas neurofibrilares están constituidas por agregados de la proteína Tau hiperfosforilada (Hampel, 2013). Las placas amiloideas son agregados extracelulares del péptido  $\beta$ A que se producen como consecuencia de la agregación del péptido (ver Figura 1) (Selkoe, 2000; Zhang, Thompson, Zhang, & Xu, 2011).

### **2.1.2. La pérdida de la olfacción durante la enfermedad de Alzheimer**

Previo al establecimiento de la patología tipo Alzheimer se presenta deterioro en la olfacción (Hawkes & Doty, 2009; Masurkar & Devanand, 2014; Stamps et al., 2013; Thompson, Knee, & Golden, 1998; Warner et al., 1986). Este deterioro se ha medido con baterías estandarizadas para la identificación olfatoria como la prueba de identificación olfatoria de la Universidad de Pensilvania o la batería de percepción olfatoria y semántica (Attems, Walker, & Jellinger, 2014; Kovács, 2004; Mesholam, Moberg, Mahr, & Doty, 1998; Thompson et al., 1998; R. S. Wilson et al., 2009). La disminución del puntaje en estas pruebas olfatorias en pacientes con EA comparados con controles ha permitido identificar que los pacientes con EA, o aquellos con predisposición a padecerla, presentan un incremento en el umbral de detección de olores (Attems et al., 2014; Kovács, 2004; Mesholam et al., 1998; Thompson et al., 1998; R. S. Wilson et al., 2009), dificultad en la identificación de olores (Mesholam et al., 1998), el reconocimiento de los mismos (Mesholam et al., 1998), así como dificultad en la discriminación entre olores (Bahar-Fuchs et al., 2010; Luzzi et al., 2007; Warner et al., 1986). Para realizar estas pruebas olfatorias se utilizan olores que sean validados como identificables por los participantes del grupo control (por ejemplo, en una versión de pruebas olfatorias diseñada para ingleses se utilizó el aroma a curri mientras que en una para italianos se cambió por aroma a cebolla) (Luzzi et al., 2007), ya que se han encontrado diferencias en los umbrales de detección, así como en las capacidades de identificación y discriminación de olores entre distintos grupos étnicos y culturales (Luzzi et al., 2007).

Diversos grupos de investigación han mostrado que la alteración olfatoria asociada a la EA correlaciona con la severidad de la demencia de los pacientes (Bahar-Fuchs et al., 2010; Hawkes & Doty, 2009; Thompson et al., 1998; R. S. Wilson et al., 2009). Estudios longitudinales han identificado a la hipofunción olfatoria como una estrategia de detección temprana de la EA (Babizhayev et al., 2011; Hawkes & Doty, 2009; Masurkar & Devanand, 2014), dado que se reportado consistentemente en distintas poblaciones. Es importante mencionar, que más del 90% de los pacientes con EA no detectan la hipofunción de su olfato hasta que se someten a una prueba (Attems et al., 2014; Daulatzai, 2015; Murphy, 1999; Nicola-Antoniou, 2011). Sin embargo, este síntoma no es exclusivo de la EA, sino que también se presenta en distintas patologías como la epilepsia del lóbulo temporal, donde la percepción de un aroma precede o predice una crisis con una prevalencia del 10% de los casos (Hawkes & Doty, 2009). Varias

enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Parkinson, también presentan deterioro olfatorio (Doty, 2012; Hawkes & Doty, 2009). En el caso de la enfermedad de Parkinson la prevalencia de disfunción olfatoria es el 89 al 90% de los casos (Doty, 2012; Hawkes & Doty, 2009) y correlaciona con la disfunción motora (Connelly, Farmer, Lynch, & Doty, 2003; Hawkes & Doty, 2009). Aunque, la deficiencia específica, o el nivel de la misma, en el desempeño de las tareas olfatorias pudiera distinguir entre las distintas patologías que sufre, o sufrirá el paciente (Mesholam et al., 1998), estas pruebas no son el único criterio diagnóstico para identificar a las distintas enfermedades neurodegenerativas que se asocian a la disfunción olfatoria pero, en el caso de pacientes con DCL, se ha demostrado que el deterioro olfatorio es un buen predictor de la progresión a la EA (Attems et al., 2014).

El deterioro en la olfacción asociado a la EA puede ligarse a la presencia de los marcadores histopatológicos característicos de la EA en el BO (Hawkes & Doty, 2009; Oliveira et al., 2015; Thompson et al., 1998). En algunos casos, se han hallado marañas neurofibrilares en la capa glomerular, así como en las fibras de salida del BO hacia la corteza olfatoria (Ohm & Braak, 1987; Oliveira et al., 2015; Thompson et al., 1998). Sin embargo, en la etapa temprana de la EA no se observan placas seniles dentro del BO (Esiri & Wilcock, 1984; Thompson et al., 1998), mientras que éstas han invadido por completo la corteza cerebral (Beer & Ulrich, 1993). Por lo anterior, se ha sugerido que el péptido  $\beta$ A en estado soluble (Figura 1) es la causa principal de las alteraciones en el funcionamiento del BO en los humanos (Esiri & Wilcock, 1984; Wesson, Nixon, Levy, & Wilson, 2011). El BO tiene conexiones con regiones corticales distintas, como la corteza transentorrinal (Ennis, Hamilton, & Hayar, 2007; Shepherd & Grillner, 2010), que es la primera corteza en dañarse durante la EA (Braak & Braak, 1991; Reitz et al., 2011). Otra corteza tempranamente dañada en la EA, la CE, tiene un papel relevante en la memoria, la emoción y la olfacción (Daulatzai, 2015; Reitz et al., 2011). Lo mismo ocurre con la corteza orbitofrontal, que es un área de asociación y percepción de la información olfatoria (Hawkes & Doty, 2009; Reitz et al., 2011).

Hasta el momento se desconoce si la deficiencia en la olfacción en la EA depende únicamente de la hipofunción en las estructuras meramente sensoriales (Cao, Rickenbacher, Rodriguez, Moulia, & Albers, 2012; Rawson et al., 2012) como el BO y el epitelio olfatorio o ésta depende también del daño en las estructuras corticales que se involucran en la percepción

(Cassano et al., 2011; Wachowiak & Shipley, 2006) y el reconocimiento de los olores (Lledo, 2005). En esta tesis nos enfocaremos en el BO por ser el primer relevo sensorial olfatorio en el sistema nervioso central (SNC) (Shepherd, G.M., 1972) y por ser una estructura muy sensible a los efectos del  $\beta$ A (Alvarado-Martínez, Salgado-Puga, & Peña-Ortega, 2013).

### **2.1.3. El péptido $\beta$ amiloide**

El péptido  $\beta$ A es sintetizado a partir de la PPA que se encuentra anclada a la membrana y cuyo gen se localiza en el cromosoma 21 de los humanos (Selkoe, Triller, & Christen, 2008). La proteólisis de la PPA se lleva a cabo por un complejo de proteínas llamado  $\beta$ -secretasa (Kamenetz et al., 2003; Zhang et al., 2011) y, posteriormente, por la  $\gamma$ -secretasa (Kamenetz et al., 2003; Peña-Ortega, Gutiérrez-Lerma, Quiroz-Baez, & Arias, 2006; Zhang et al., 2011), lo que produce el péptido  $\beta$ A mediante la llamada vía amiloidogénica (Kamenetz et al., 2003; Zhang et al., 2011). A partir de esta vía proteolítica de la PPA, se sintetiza un péptido de 39 a 42 aminoácidos, cuya sobreproducción y acumulación es la responsable de la formación de las placas seniles en la EA (Kamenetz et al., 2003; Peña-Ortega et al., 2006; Zhang et al., 2011), así como de muchos síntomas de la misma (Beer & Ulrich, 1993; Cummings, Pike, Shankle, & Cotman, 1996; Hampel, 2013). Una vez producido, el péptido  $\beta$ A pasa por diferentes estados de agregación que son inicialmente solubles y que cursan hacia un estado insoluble que forma las placas seniles (ver Figura 1) fuera de las neuronas (Higuchi, Iwata, & Saido, 2005; Zhang et al., 2011). La forma oligomérica del  $\beta$ A<sub>1-42</sub> (la secuencia de 42 aminoácidos) aumenta en el fluido intersticial cerebral de los pacientes con EA (Kamenetz et al., 2003; Lue et al., 1999; Zhang et al., 2011). En este sentido, se ha mostrado que el péptido  $\beta$ A puede afectar la comunicación neuronal y perturba las redes integradas por neuronas interrelacionadas, lo que a su vez, impedirá la función cognitiva (Peña-Ortega, 2013), algunos experimentos que apoyan esta hipótesis se mencionarán más adelante.

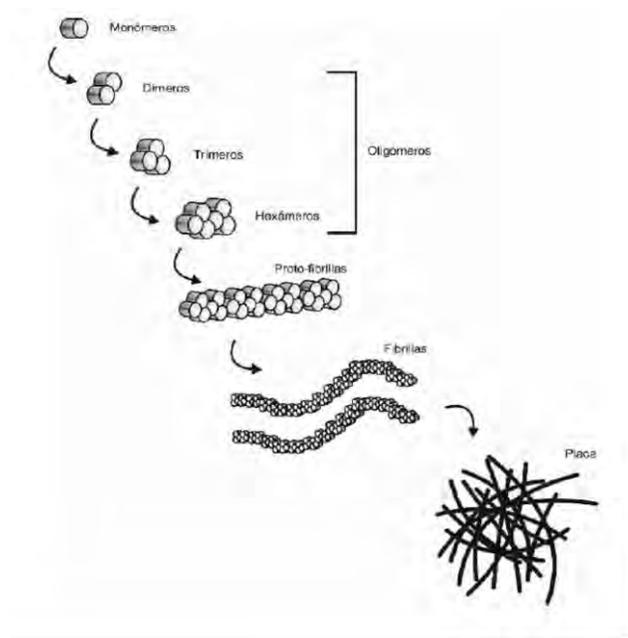
#### **2.1.4. Funciones fisiológicas del péptido $\beta$ A**

El péptido  $\beta$ A soluble (Figura 1) tiene una papel fisiológico en el SNC (Puzzo et al., 2008, 2011; Salgado-Puga & Peña-Ortega, 2015). El péptido  $\beta$ A soluble se libera al espacio sináptico en función de la actividad neuronal (Cirrito et al., 2005) y participa en la regulación de la transmisión sináptica, así como en la consolidación y en la evocación de la memoria (Puzzo et al., 2008, 2011; Salgado-Puga & Peña-Ortega, 2015). Coincidentemente, se ha identificado que el péptido  $\beta$ A, en concentraciones picomolares (200 pM), es indispensable para mantener la transmisión sináptica y la potenciación a largo plazo (PLP) (Garcia-Osta & Alberini, 2009; Puzzo et al., 2008). El péptido  $\beta$ A también es necesario para el desempeño adecuado de tareas de memoria espacial (laberinto de Morris) (Garcia-Osta & Alberini, 2009). Es decir, que la disminución del  $\beta$ A evita que el animal encuentre la plataforma de escape (Garcia-Osta & Alberini, 2009). Por otra parte, la administración de dosis bajas del péptido  $\beta$ A mejora el desempeño de la misma tarea (reduce el tiempo para encontrar la plataforma de escape), así como otras tareas de aprendizaje asociativo como el condicionamiento al miedo (incrementa la conducta de congelamiento) (Puzzo et al., 2008). Además, la aplicación del péptido  $\beta$ A en el rango pM incrementa la PLP en rebanadas de cerebro (Puzzo et al., 2008). Todo lo anterior indica que una concentración del péptido  $\beta$ A en el rango pM es necesaria para la transmisión sináptica, la plasticidad sináptica, la memoria y el aprendizaje (Puzzo et al., 2011). Coincidentemente la disminución de la producción endógena de  $\beta$ A, mediante el uso de un ácido ribonucleico de interferencia, evita la PLP en un modelo murino, (Puzzo et al., 2011). Este efecto puede ser revertido al aplicar  $\beta$ A<sub>1-42</sub> humana a una concentración pM (Puzzo et al., 2011). También se ha demostrado que durante una tarea de evitación pasiva, el  $\beta$ A se libera en el hipocampo y participa en la codificación de la misma (Garcia-Osta & Alberini, 2009), pues la aplicación de un anticuerpo que neutraliza al  $\beta$ A liberado interfiere con el desempeño de la tarea, afectando a la memoria de corto y de largo plazo (Garcia-Osta & Alberini, 2009). El efecto del anticuerpo neutralizante es revertido por la infusión del péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub> exógeno (Garcia-Osta & Alberini, 2009; Puzzo et al., 2011).

#### **2.1.5. Efecto patológico del péptido $\beta$ A**

Cabe señalar que la función fisiológica del péptido  $\beta$ A depende de la concentración y del estado de oligomerización (Kurudenkandy et al., 2014; Pettit & Yakel, 2001). Como se ha mencionado

previamente, la liberación de  $\beta$ A en un rango pM es indispensable para la memoria y para la facilitación sináptica (sustrato celular de la misma) (Cirrito et al., 2005; Garcia-Osta & Alberini, 2009; Puzzo et al., 2008, 2011). Sin embargo, el incremento del  $\beta$ A entre 100 nM y 1  $\mu$ M (Kurudenkandy et al., 2014; Pettit & Yaker, 2001) produce reducción de la transmisión sináptica (Pettit & Yaker, 2001; Puzzo et al., 2008; Sun & Alkon, 2002). Este efecto patológico del  $\beta$ A depende del tiempo de exposición al  $\beta$ A (Kurudenkandy et al., 2014) y del estado de agregación del mismo (Kurudenkandy et al., 2014). Coincidentemente, el  $\beta$ A puede reducir la actividad oscilatoria poblacional de manera dependiente de su estado de agregación (Figura 1) y del tiempo de exposición (Alvarado-Martínez, 2012; Kurudenkandy et al., 2014). Datos de nuestro laboratorio han demostrado que la aplicación del  $\beta$ A<sub>1-42</sub> soluble disminuye la actividad espontánea poblacional *in vitro* e *in vivo* del hipocampo (Adaya-Villanueva, Ordaz, Balleza-Tapia, Márquez-Ramos, & Peña-Ortega, 2010; Peña-Ortega et al., 2010, 2006; Peña-Ortega & Bernal-Pedraza, 2012), de la CE (Peña-Ortega, Solís-Cisneros, Ordaz, Balleza-Tapia, & Lopez-Guerrero, 2012) y del BO (Alvarado-Martínez et al., 2013).



**Figura 1 Modelo de agregación del péptido  $\beta$ A**

Los monómeros del péptido  $\beta$ A se agregan para formar oligómeros de tamaños distintos. Los oligómeros más grandes (hexámeros) sirven como unidad estable que formará las protofibrillas y, eventualmente, las placas amiloides (Tomado de Balleza-Tapia, 2014).

Distintos grupos de investigación, incluido el nuestro, han demostrado que la actividad oscilatoria en el SNC es fundamental para el óptimo funcionamiento de los circuitos neuronales (Adaya-Villanueva et al., 2010; Alvarado-Martínez et al., 2013; Peña-Ortega, 2013; Peña-Ortega et al., 2010) e interferir con ésta se refleja en problemas de aprendizaje y falla en la consolidación de la memoria (Pettit & Yakel, 2001; Salgado-Puga, Prado-Alcalá, & Peña-Ortega, 2015; Sun & Alkon, 2002). De igual forma, se ha encontrado una modificación característica en el patrón electroencefalográfico (incremento en la potencia de las ondas lentas) en pacientes diagnosticados con DCL y EA (Lizio et al., 2011), que correlaciona con la afectación de los procesos psicológicos de orden superior que acompañan a la EA (Bäckman et al., 2004; Förstl & Kurz, 1999; Small et al., 1998). Teniendo en cuenta lo anterior, se han diseñado aproximaciones experimentales mediante modelos animales para identificar la etiología de aspectos específicos de la EA que a continuación se describirán brevemente en lo que respecta a la disfunción olfatoria.

#### **2.1.6. Deterioro olfatorio en los modelos animales de la enfermedad de Alzheimer**

Varios modelos animales que promueven la sobreproducción y/o la acumulación del péptido  $\beta$ A (Masurkar & Devanand, 2014), han permitido caracterizar el efecto patológico del péptido  $\beta$ A en la transmisión sináptica (Arendt, 2009; Salgado-Puga & Peña-Ortega, 2015), su participación en la disfunción e hiperfosforilación de la proteína Tau (Shipton et al., 2011) y su impacto patológico a nivel cognitivo y conductual (Masurkar & Devanand, 2014; Shipton et al., 2011).

Los ratones transgénicos que modelan la EA expresan uno o más genes humanos mutados y catalogados como amiloidogénicos (que promueven la producción y la acumulación de  $\beta$ A) (Masurkar & Devanand, 2014). Entre la gran variedad de animales transgénicos con estas características se encuentran los ratones Tg2576 (Jacobsen et al., 2006), los APP/PS1 (Duyckaerts, Potier, & Delatour, 2007), los 5xFAD (Duyckaerts et al., 2007) y los triple transgénicos (3xTg) (Oddo et al., 2003). Estos dos últimos modelos, incluyen además una mutación asociada con la hiperfosforilación de la proteína Tau (Masurkar & Devanand, 2014). Estos modelos animales muestran un fenotipo parecido a la EA (Duyckaerts et al., 2007), como alteraciones en la memoria (Salgado-Puga et al., 2015) y deterioro olfatorio (Masurkar & Devanand, 2014).

El deterioro olfatorio puede ser identificado conductualmente por la disminución (hiposmia) o la pérdida (anosmia) de la capacidad para oler (Masurkar & Devanand, 2014). La hiposmia es una característica que acompaña al envejecimiento (Bahar-Fuchs et al., 2010; Daulatzai, 2015; R. S. Wilson et al., 2009). Sin embargo, esta disfunción olfatoria se agrava en modelos murinos de la EA que, además, presentan alteraciones en la actividad eléctrica del BO (Liu et al., 2013), lo que repercute en el procesamiento de la información sensorial olfatoria (Masurkar & Devanand, 2014) y en el desempeño de tareas olfatorias que incluyen deficiencia en la identificación (Alvarado-Martínez et al., 2013), habituación (Wesson, Levy, Nixon, & Wilson, 2010) y discriminación (Masurkar & Devanand, 2014; Wesson et al., 2010) de olores. Los modelos animales de la EA también cursan con deterioro en la memoria olfatoria (Masurkar & Devanand, 2014).

Las alteraciones en el desempeño de la tareas olfatorias se observan en los ratones transgénicos para la EA antes de que éstos exhiban signos histopatológicos característicos de la enfermedad (Masurkar & Devanand, 2014). Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión de la hAPP<sub>sw</sub> (proteína precursora del amiloide humana con la “mutación sueca”) en las neuronas sensoriales olfatorias (NOS, primer relevo sensorial de información olfatoria) genera que estas neuronas no dirijan sus axones a su blanco correspondiente (Cao, Schrank, et al., 2012).

La relación que existe entre la concentración de  $\beta$ A soluble en el BO y el deterioro temprano en la capacidad olfativa (Wesson et al., 2011), ha conducido a estudiar la posible causalidad entre la sobreproducción de este péptido y el deterioro olfativo que se presenta en las etapas tempranas tanto en los pacientes con EA, como los ratones transgénicos modelo de esta enfermedad (Franks, Chuah, King, & Vickers, 2015; Wesson et al., 2010; Young, Sharkey, & Finlayson, 2009). Por ejemplo, Wesson y colaboradores (2010) demostraron que ratones transgénicos que sobreexpresan la PPA, poseen un desempeño bajo en pruebas de discriminación olfativa a partir del sexto mes de vida, mismo que se mantiene durante el envejecimiento (Wesson et al., 2010). En estos ratones, se identificó que la presencia del  $\beta$ A soluble de forma temprana correlaciona con el bajo desempeño de las pruebas olfatorias (Wesson et al., 2010). De manera congruente, se ha encontrado que la inmunización contra el  $\beta$ A restablece la olfacción en estos ratones transgénicos (Wesson, Morales-Corraliza, Mazzella, Wilson, & Mathews, 2013). Estos estudios han identificado que las interneuronas son particularmente susceptibles al daño por

el  $\beta$ A, pues animales que sobre-expresan la PPA tienen menor número de interneuronas en el BO (Saiz-Sanchez, De La Rosa-Prieto, Ubeda-Bañon, & Martinez-Marcos, 2013) y en la corteza piriforme (corteza olfatoria primaria) de manera correlacionada con la cantidad de depósitos de  $\beta$ A (Saiz-Sanchez, Ubeda-Bañon, la Rosa-Prieto, & Martinez-Marcos, 2012). Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el BO es una estructura sensible al efecto agudo del péptido  $\beta$ A, el cual altera la actividad eléctrica de las neuronas del BO y evita la detección de aromas (Alvarado-Martínez et al., 2013). A continuación se abordará la circuitería del BO.

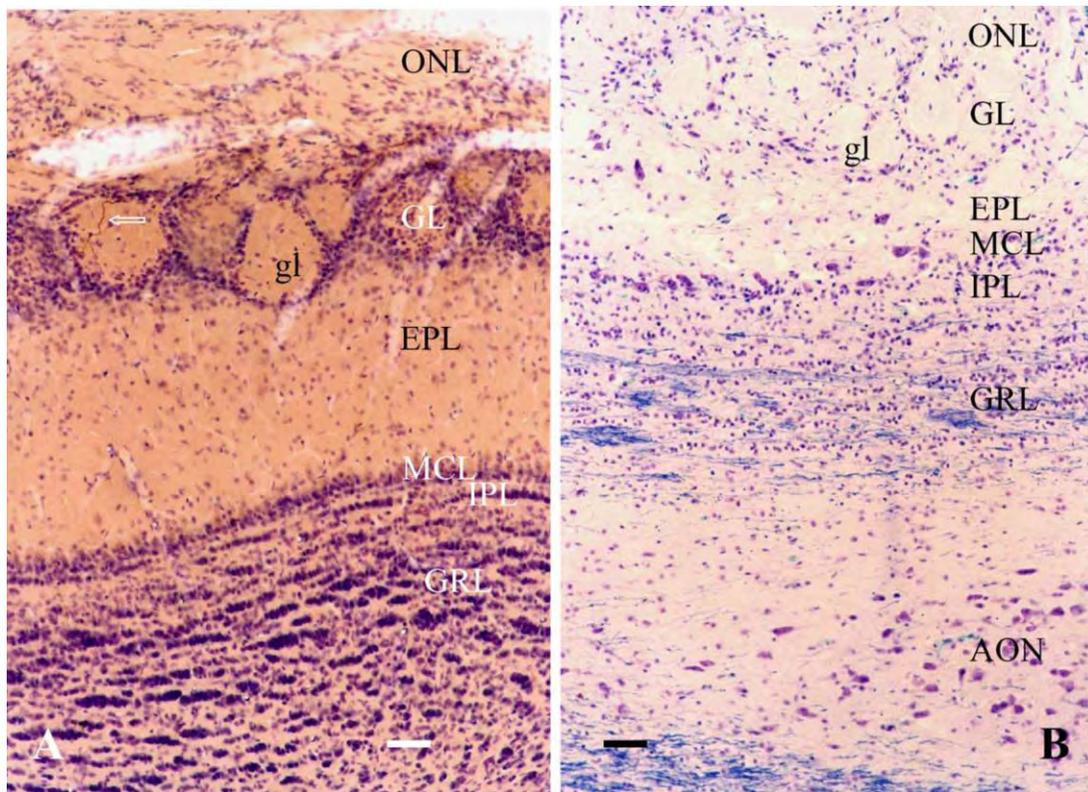
## **2.2. Fisiología del bulbo olfatorio**

El BO es parte del sistema olfativo que se encarga de censar y percibir los aromas (Purves et al., 2008). El sistema olfatorio está formado por el epitelio olfatorio, el BO, la corteza piriforme, el núcleo olfatorio anterior, el tubérculo olfatorio, la amígdala y la CE (Shepherd, G.M., 1972; Tong, Peace, & Cleland, 2014). Esta configuración se encuentra altamente conservada en los vertebrados (Mombaerts et al., 1996; Shepherd & Grillner, 2010) (Figura 2).

Las neuronas olfatorias sensoriales NOS se encuentran embebidas en un epitelio especializado dentro de la cavidad nasal, llamado epitelio olfatorio (en el humano ocupa aproximadamente  $5\text{cm}^2$ ) (Kandel, 2012). Las NOS son neuronas bipolares cuya dendrita apical está dispuesta en la superficie del epitelio olfatorio donde expresa en mayor densidad a los receptores olfatorios (Buck, 1992; Sullivan, Ressler, & Buck, 1995). Los humanos tienen aproximadamente 350 genes de receptores olfatorios diferentes, mientras que los ratones poseen aproximadamente 1,000 (Buck, 1996; Kandel, 2012). Cada NOS expresa un solo receptor olfatorio (Buck, 1992), mientras que cada receptor reconoce múltiples olores (Kandel, 2012). Por otra parte, cada molécula odorante es detectada por diferentes tipos de receptores (Kandel, 2012). La respuesta diferencial de las NOS a cada olor crea “campos receptivos” llamados rangos receptivos moleculares en el sistema olfatorio (Mori, 2006; Shepherd & Grillner, 2010).

El conjunto de las NOS proyecta su axón no mielinizado hacia los glomérulos en la primera capa del BO, llamada capa glomerular (Tong et al., 2014), y forman así al nervio olfatorio. En cada glomérulo convergen distintos axones que reciben información de neuronas que expresan al mismo receptor olfatorio (Mombaerts et al., 1996; Tong et al., 2014). Dado que cada aroma es reconocido por diferentes NOS, éstas activan una combinación particular de

glomérulos que, detectados mediante técnicas de imagen, forman patrones de activación espacial, llamados mapas glomerulares olfatorios (Vincis, Gschwend, Bhaukaurally, Beroud, & Carleton, 2012). Cada molécula o combinación de ellas está asociada con su mapa olfatorio propio (Shepherd & Grillner, 2010). Por lo tanto, cada aroma es detectado por un ensamble neuronal distinto (Kandel, 2012).

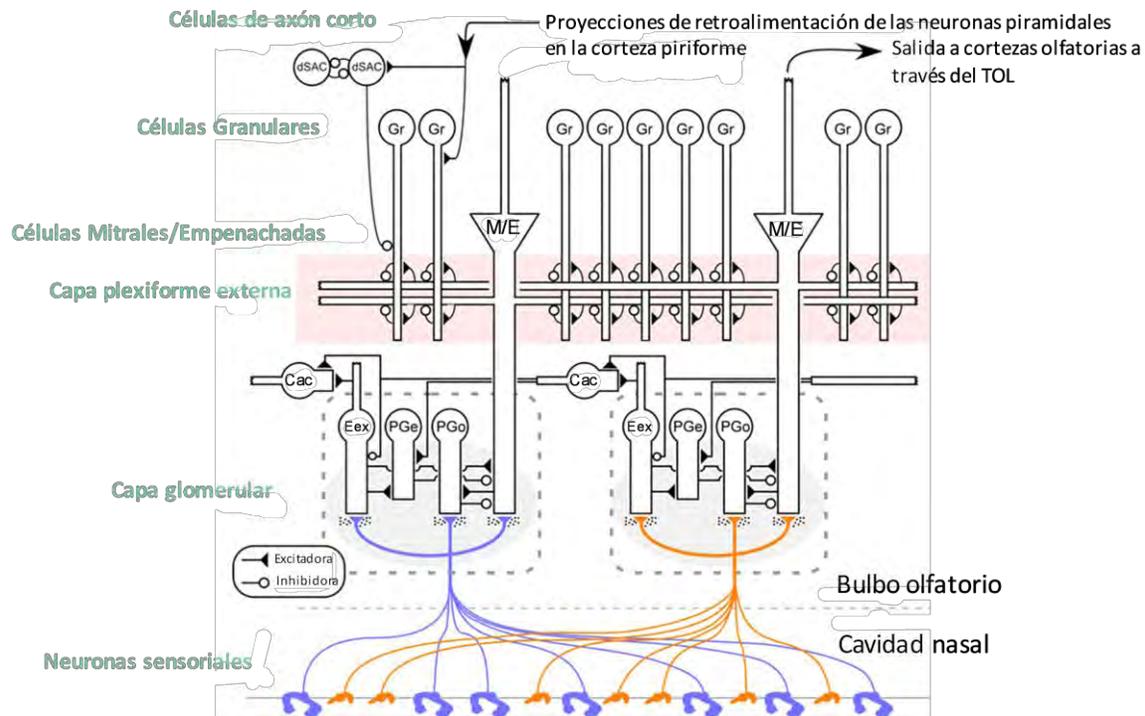


**Figura 2 Anatomía comparada del bulbo olfatorio de la rata y del humano**

**A. Micrografía de BO de rata.** El BO se organiza en capas claramente definidas y organizadas. La capa más superficial se forma por el nervio olfatorio (ONL), la cual rodea a la capa glomerular (GL) compuesta de glomérulos circundados por células periglomerulares. La capa plexiforme externa (EPL) es amplia en los roedores, mientras que la capa plexiforme interna (IPL) es muy delgada. Entre las últimas dos capas está la capa mitral (MCL) la cual está formada por los somas de las neuronas mitrales. La capa granular (GRL) está formada por las neuronas granulares. La flecha señala una fibra del nervio trigeminal que inerva las capas superficiales del BO marcada mediante inmunoreactividad al péptido relacionado al gen de la calcitonina. El tejido fue contrateñido con violeta de cresilo **B. Micrografía de BO humano.** En este caso, las capas están menos definidas comparadas con el BO de la rata. A diferencia de lo mostrado en el OB de rata, se puede observar un grupo de neuronas multipolares embebido en la capa granular, mismas que forman el núcleo olfatorio anterior (AON). El BO fue teñido con la técnica de Klüver-Barrera (luxol azul rápido/violeta de cresilo). La barra representa 100 µm (Kovács, 2004).

Los glomérulos son estructuras esféricas que se forman a partir de la conexión entre el axón de las NOS y las dendritas apicales de las neuronas principales del BO, las células mitrales y empenachadas (M/E) (Mombaerts et al., 1996; Mori, Matsumoto, Tsuno, & Igarashi, 2009; Nagayama, Homma, & Imamura, 2014; Shepherd, G.M., 1972; Tong et al., 2014). Los glomérulos contienen también interneuronas periglomerulares (PG) que modulan la información de forma intra e interglomerular (Mombaerts et al., 1996; Mori et al., 2009; Nagayama et al., 2014; Shepherd, G.M., 1972; Tong et al., 2014). Adyacente a la capa glomerular, se localiza la capa plexiforme externa que se forma de las dendritas basales de las neuronas M/E, así como de proyecciones de las neuronas Gr, de las neuronas de axón corto (CAc) y de los somas de las células empenachadas externas (Nagayama et al., 2014). Tanto las Gr, como las CAc conforman el componente inhibitorio que modula la salida de información llevada por las neuronas principales (Shepherd, G.M., 1972; Tong et al., 2014). Debajo de la capa plexiforme externa, se halla una línea delgada y ordenada de somas de las neuronas mitrales (Mombaerts et al., 1996; Shepherd, G.M., 1972). Los axones de las neuronas de proyección (M/E) del BO forman el TOL, que es la vía de salida de la información del BO hacia la corteza piriforme, el núcleo olfatorio anterior, el tubérculo olfatorio, la amígdala y la CE (Shepherd, G.M., 1972; Tong et al., 2014). Justo debajo de la capa mitral, se localiza la capa plexiforme interna, formada por las dendritas ascendentes de las Gr profundas, así como por los axones provenientes de diversas regiones corticales (Mori et al., 2009; Nagayama et al., 2014; Shepherd, Chen, Willhite, Migliore, & Greer, 2007). La capa más profunda del BO se forma por las células Gr densamente agrupadas que se separan entre sí por haces de fibras nerviosas y por interneuronas (ver Figura 3) (Shepherd et al., 2007; Tong et al., 2014).

La modulación del disparo de las neuronas M/E es muy compleja (Nagayama et al., 2014; Shepherd, G.M., 1972) e involucra, entre otros elementos neuronales del BO, a la retroalimentación producida por las Gr (Shepherd et al., 2007; Tong et al., 2014). Las Gr carecen de axón por lo que su acción inhibitoria sobre las células M/E está dada por sinapsis dendrodendríticas cuyo papel es regular el flujo de la información olfatoria que se dirige a la corteza y que viaja a través del tracto olfatorio lateral y del tracto olfatorio medial (Friedman & Strowbridge, 2003; Nagayama et al., 2014; Shepherd et al., 2007) (ver Figura 3). Esta comunicación se retroalimenta mediante las fibras centrífugas que proyectan de regreso hasta el BO (Buck, 1996; Yuan & Knöpfel, 2006).



**Figura 3** Circuitería del bulbo olfatorio

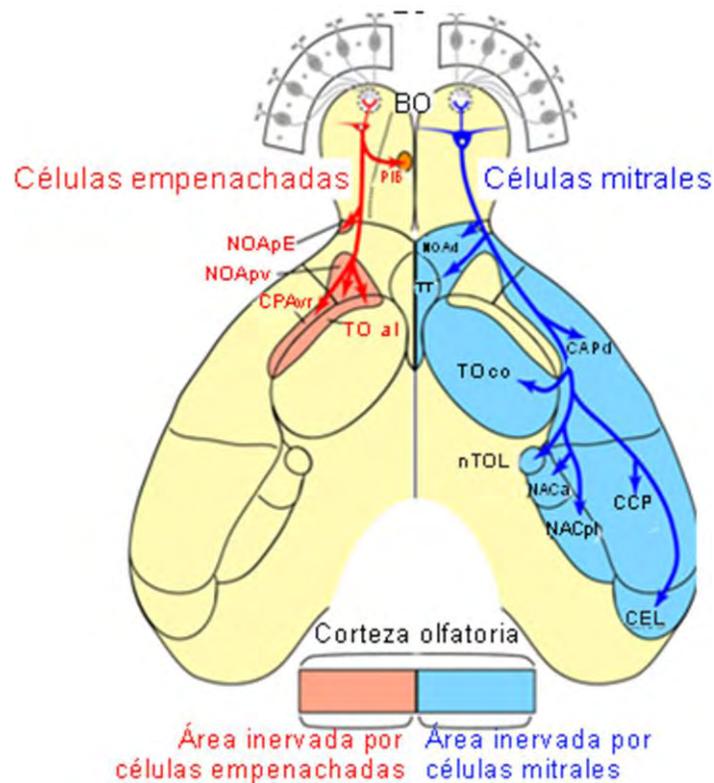
En la parte inferior del esquema se muestran las neuronas sensoriales (en azul y anaranjado). Cada una de estas neuronas sensoriales proyecta su axón a un glomérulo (en la capa glomerular) que recibe aferencias de neuronas que expresan el mismo receptor. En los glomérulos hay células periglomerulares (excitadoras, PGe e inhibitoras, PGo). La información de las neuronas sensoriales es recibida por la dendrita apical de las neuronas de proyección mitrales y empenachadas (M/E) cuyas dendritas basales se encuentran en la capa plexiforme externa. La inhibición de las neuronas de proyección la realizan, en parte, las células granulares (Gr) cuyos somas se encuentran en la capa granular. Los axones de las células de proyección (M/E) viajan hacia la corteza por el tracto olfatorio lateral (TOL). Finalmente, las fibras centrífugas provenientes de la corteza piriforme constituyen una vía de retroalimentación cortical hacia el BO. Las células de axón corto (CAc) están ampliamente distribuidas en el BO y también forman parte del componente inhibitorio (Modificada de: Tong et al, 2014).

### 2.2.1. Propiedades electrofisiológicas del bulbo olfatorio

El BO posee distintas capas de células con propiedades intrínsecas y sinápticas diversas (Adrian, 1950) que determinan su forma de responder a la información enviada por las NOS ante los estímulos olfatorios (Kay, 2014). A partir del registro de los potenciales locales de campo (PLC), se ha demostrado que la información olfativa se relaciona con la generación de patrones de actividad poblacional en el BO (Adrian, 1950; Kay, 2014) y otros circuitos olfatorios.

El registro de los PLC permite medir cuantitativamente el cambio en el potencial (voltaje) extracelular de cualquier tejido. En el SNC el PLC refleja el cambio promedio/sincronizado de la actividad celular, principalmente neuronal, y está influenciado por todos los procesos iónicos que ocurren en el tejido e incluyen las oscilaciones intrínsecas, los potenciales post-sinápticos excitadores e inhibitorios, los potenciales de acción y su propagación (Buzsáki, Anastassiou, & Koch, 2012). Con esta técnica, se han identificado 3 oscilaciones principales en el BO: theta ( $\theta$ ,

2-12 Hz); beta ( $\beta$ , 15-30 Hz) y gamma ( $\gamma$ , 40-100 Hz) (Kay, 2014, 2015), que pueden dar información acerca del estado funcional del circuito del BO (Lowry & Kay, 2007). La oscilación dominante en el BO es la oscilación  $\theta$  (Kay, 2014, 2015) que se asocia directamente con la estimulación mecánica en las NOS inducida por la entrada de aire regulada por la respiración (Kay, 2014, 2015). Durante la inmovilidad y el descanso se puede registrar una onda  $\theta$  lenta (2-4 Hz) (Kay, 2014, 2015); mientras que, en un proceso activo de exploración y de olfateo (*sniffing*) el ritmo  $\theta$  aumenta de frecuencia (5-12 Hz) (Gourevitch, Kay, & Martin, 2010; Kay, 2014).



**Figura 4 Vías paralelas de proyección de las neuronas principales del bulbo olfatorio y sus diferentes blancos hacia la corteza**

Las neuronas empenachadas (en rojo) proyectan a regiones más anteriores y proximales del sistema olfatorio, como la región posteroventral del núcleo olfatorio anterior (NOApv) y la *pars externa* (NOApE) del mismo núcleo, la corteza piriforme anterior ventro rostral (CPAvr) y el tubérculo olfatorio anterolateral (TO al). Por ello, su respuesta tiene una latencia corta. Por su parte, las neuronas mitrales (azul) proyectan a regiones más dispersas y distales en corteza, como el la región dorsal del núcleo olfatorio anterior (NOAd), la tenia tecta (TT), la región cortical del TO (TOco), el núcleo del tracto olfatorio lateral (nTOL), la región anterior del núcleo amigdalóide cortical (NACa) y la región posterolateral del mismo núcleo (NACpl), la corteza piriforme anterior dorsal (CPAd), la corteza piriforme posterior (CPP), y corteza entorrinal lateral (CEL) (Tomadoy modificado de: Igarashi e Ieki, 2012).

Los tipos neuronales reclutados durante la exposición a un olor son distintas de acuerdo a las neuronas principales (M/E) activadas (ver Figura 4) (Gourevitch et al., 2010; Kay & Laurent, 1999; Lowry & Kay, 2007; Martin et al., 2007). Se ha demostrado que las neuronas M/E disparan en fases distintas de la respiración y tienen diferentes latencias de activación ante la respuesta a

olores (Fukunaga, Berning, Kollo, Schmaltz, & Schaefer, 2012) (Figura 4). Las neuronas empenachadas proveen las eferencias más rostrales, incluido el tubérculo olfatorio y su disparo corresponde a la fase temprana de la respiración, mientras que las neuronas mitrales proyectan a regiones más difusas y disparan en periodos tardíos de la inspiración (Fukunaga et al., 2012).

La correlación de la actividad eléctrica entre el BO y otras estructuras (como el hipocampo) permite establecer relaciones dinámicas que demuestran la comunicación dentro de estos circuitos (Adrian, 1950; Kay et al., 2009; Rojas-Líbano & Kay, 2008; Wachowiak & Shipley, 2006). La exposición a olores produce oscilaciones que son consecuencia de las descargas sincronizadas (sincronía, coincidencia de hechos y fenómenos en el tiempo) y rítmicas de un gran grupo de neuronas (Lagier, 2004). Por ejemplo, la presencia de un olor provoca un aumento de la oscilación  $\gamma$  al final de la inhalación en el BO y en la corteza piriforme (Lagier, 2004). Las oscilaciones  $\theta$  y  $\gamma$  se asocian con en el procesamiento del olor (Friedman & Strowbridge, 2003; Lowry & Kay, 2007). La oscilación  $\beta$  en el BO se ha identificado en murinos despiertos durante la exposición a odorantes volátiles (Lowry & Kay, 2007). Esta oscilación depende de las fibras centrífugas (fibras de tipo colinérgico, serotoninérgico y noradrenérgico), pues si estas fibras se lesionan se abole el ritmo  $\beta$  en el BO (Martin, Gervais, Messaoudi, & Ravel, 2006). El incremento en la potencia de la oscilación  $\beta$  (15-30 Hz) y el aumento en la coherencia entre el BO y el hipocampo durante la exposición a un aroma en tareas de discriminación olfatoria y de aprendizaje asociativo (Kay, 2014; Martin et al., 2007) permiten la codificación neural de la información olfatoria entre ambas estructuras (Gourevitch et al., 2010).

La oscilación  $\gamma$  se genera por las sinapsis dendrodendríticas entre las dendritas basales de las M/E con las Gr (Bathellier, 2005; Friedman & Strowbridge, 2003; Kay, 2014; Martin & Ravel, 2014). La oscilación  $\gamma$  se considera parte del procesamiento local de la información olfatoria (Kay, 2014, 2015).

Las neuronas mitrales incrementa su disparo en función de la concentración del aroma, lo que produce un mayor reclutamiento de Gr y un efecto mayor en el número de células mitrales que muestran respuestas inhibitorias (inhibición lateral) durante la inhalación y un aumento en el número de células mitrales que muestran respuestas excitadoras (excitación lateral) durante la exhalación (Kay, 2014). La activación dendrodendrítica de las células Gr por las neuronas M/E se produce por la activación dendrodendrítica de los receptores glutamatérgicos del tipo N-metil-D-

aspartato (NMDA); lo que provoca la liberación de ácido gamma-amino butírico (GABA) hacia el espacio sináptico (Friedman & Strowbridge, 2003). La liberación de GABA, durante este proceso, permite la generación de ventanas de sincronización en las células mitrales (McTavish, Migliore, Shepherd, & Hines, 2012).

### **2.2.2. Cambios electrofisiológicos en el bulbo en modelos de la enfermedad de Alzheimer**

En nuestro laboratorio, se han realizado registros en la capa granular de rebanadas de BO de ratón y se ha encontrado que la aplicación aguda del  $\beta A_{1-42}$  provoca una reducción de la potencia de la actividad espontánea poblacional de manera dependiente de la concentración (3, 10 y 30 nM) y de la edad del ratón (3, 6 y 8 semanas) (Alvarado-Martínez, 2012). Esta disminución en la actividad bulbar correlaciona con un deficiencia olfatoria en la prueba del alimento enterrado en ratones inyectados intrabulbarmente con  $\beta A$  (Alvarado-Martínez et al., 2013). Esta alteración en la actividad eléctrica podría conducir al empobrecimiento de la especificidad en la respuesta a los odorantes (Masurkar & Devanand, 2014), a alteraciones en el envío de información hacia las cortezas asociadas a la olfacción (Igarashi et al., 2012) y/o al deterioro en la respuesta cortical (Masurkar & Devanand, 2014). También se ha demostrado que en un modelo transgénico para la EA la coherencia entre los bulbos olfatorios *in vivo* está disminuida (Liu et al., 2013).

En resumen, la hipofunción olfatoria que precede a la manifestación clínica de la EA, se expresa en modelos animales de la EA y puede ser reproducida por la aplicación tópica de  $\beta A$  en el BO. Debido esto, es interesante utilizar estos modelos para evaluar estrategias preventivas, farmacológicas y no farmacológicas para contrarrestar el daño inducido por el péptido  $\beta A$  soluble tanto a nivel funcional como conductual. Una estrategia puede ser la estimulación olfatoria.

### **2.2.3. El enriquecimiento olfatorio**

El BO es una de las estructuras del SNC que recambia continuamente su composición celular a lo largo de la vida adulta, cada día arriban al BO entre 10 000 y 30 000 precursores nuevos (Lledo & Lazarini, 2007). La sobrevivencia (Rocheffort, Gheusi, Vincent, & Lledo, 2002) e integración de estas neuronas nuevas al circuito del BO es facilitada por la estimulación olfativa (A. J. Johnson, 2011; Livneh et al., 2014).

El EO fue implementado por Hennessy en 1977 con el objetivo de evaluar el efecto de la pre-exposición prolongada a mezclas de olores sobre la respuesta apetitiva de ratones recién nacidos (Hennessy, Smotherman, & Levine, 1977; Leon, Galef, & Behse, 1977). Años más tarde, se encontró que el BO de animales expuestos a una serie de olores familiares incrementa su actividad neuronal medida por la 2, desoxi-D-glucosa (2-DG) (Coopersmith et al., 1986; Coopersmith & Leon, 1986), la 2-DG es un análogo de la glucosa que puede ser incorporado a las células por los transportadores de glucosa, por lo que se asume que aquellas células que tengan mayor actividad aumentarán la incorporación de la 2-DG (Astic & Cattarelli, 1982; Hökfelt et al., 1983; Lundgaard et al., 2015). También se encontró que el EO aumenta el tamaño de los glomérulos, (Woo et al., 1987) y reduce el número y la densidad de receptores  $\beta_2$  adrenérgicos en el BO (Woo & Leon, 1995), mismos que normalmente tienen efectos inhibidores sobre la actividad neural (Kandel, 2012). También se ha demostrado que después del EO hay una menor proporción de neuronas mitrales que responden ante un aroma familiar o novedoso (Buonviso & Chaput, 2000; Buonviso, Gervais, Chalansonnet, & Chaput, 1998; D. A. Wilson, Sullivan, & Leon, 1985; D. A. Wilson et al., 1985). Esto da indicios de que EO cambia la configuración el BO y simplifica los patrones de respuesta ante olores (Buonviso y Chaput, 2000). Estos hallazgos, en conjunto, indican que el BO es sensible al EO y que responde con modificaciones en su respuesta neuronal (Coopersmith et al., 1986; Coopersmith & Leon, 1986; Woo et al., 1987).

Además de los cambios funcionales producidos por el EO, Rochefort y colaboradores (2002) demostraron que el EO es capaz de favorecer la supervivencia de los progenitores neurales que migran del área subventricular hacia el BO (Rochefort et al., 2002). Este tipo de EO puede aumentar también la supervivencia de las NOS (Watt et al., 2004) y de la interneuronas glomerulares y Gr (Woo et al., 1987). En animales adultos, el EO puede inducir que los astrocitos que se encuentran en la vía rostral migratoria se diferencien en interneuronas glomerulares o neuronas Gr (Alonso et al., 2008). Livneh y colaboradores (2014), confirmaron que las neuronas nuevas son reclutadas y mantenidas gracias a la estimulación olfatoria y responden selectivamente ante olores familiares (Livneh et al., 2014). Lo anterior, refleja que la integración de las neuronas nuevas es favorecida por la experiencia. El EO no solo favorece la integración y supervivencia de neuronas en el BO, sino también en la corteza piriforme (corteza olfatoria primaria) (Shapiro, Ng, Zhou, & Ribak, 2007).

A nivel conductual, el EO ha mostrado tener varias ventajas (Escanilla, Mandairon, & Linster, 2008; Mandairon, Stack, Kiselycznyk, & Linster, 2006b; Mandairon, Stack, & Linster, 2006; Rochefort et al., 2002). Por ejemplo, los animales sometidos a EO se desempeñan mejor en tareas de memoria olfativa (Rochefort et al., 2002), pueden ejecutar mejor tareas de discriminación de olores (Escanilla et al., 2008; Mandairon, Stack, Kiselycznyk, et al., 2006b) y son capaces de reconocer componentes individuales en mezclas de olores (Mandairon, Stack, & Linster, 2006). También se ha descrito que el EO puede tener un efecto benéfico en aquellos animales que fueron aislados socialmente (Gusmão et al., 2012). Si bien el BO es altamente responsivo a la estimulación olfatoria, esta modulación cambia a lo largo de la vida. Rey y colaboradores (2012) evaluaron el efecto de la edad en la respuesta al EO, el cual mejora la memoria olfatoria en animales jóvenes (2 meses) y adultos (10 meses), pero no en animales viejos (23 meses) (Rey, Sacquet, Veyrac, Jourdan, & Didier, 2012).

Esta serie de experimentos demuestran que el BO se adapta ante la estimulación olfatoria y tiene efectos de corto y de largo plazo. Esta plasticidad se manifiesta en la morfología (Woo et al., 1987; Woo & Leon, 1995), en el metabolismo (Coopersmith et al., 1986; Coopersmith & Leon, 1986), en la respuesta electrofisiológica (Buonviso & Chaput, 2000; Buonviso et al., 1998), en la capacidad neurogénica (Magavi, Mitchell, Szentirmai, Carter, & Macklis, 2005; Rochefort et al., 2002; Veyrac et al., 2009), en la migración y en la sobrevivencia de las neuronas PG y las Gr del BO (Escanilla et al., 2008; Mandairon, Stack, Kiselycznyk, et al., 2006b; Mandairon, Stack, & Linster, 2006; Rochefort et al., 2002). Pero, ¿el EO podría retrasar la aparición de síntomas tempranos de la EA? Es probable que sí, pues existen estrategias no farmacológicas como el enriquecimiento ambiental y el ejercicio voluntario que han demostrado ser útiles para disminuir la densidad y el número de placas amiloideas (Lazarov et al., 2005), incrementar la expresión de una enzima de degradación del  $\beta$ A (neprilisina) (Lazarov et al., 2005), favorecer la integración de nuevas neuronas y la formación de dendritas (Valero et al., 2011), además de aumentar el número de sinapsis (Nithianantharajah, 2004; Nithianantharajah & Hannan, 2006; van Praag, Kempermann, & Gage, 2000). Estos cambios se reflejan en que estas estrategias no farmacológicas evitan las alteraciones en la memoria (Bilkei-Gorzo, 2014; Herring et al., 2009; Jankowsky, 2005; Rodriguez et al., 2011; Valero et al., 2011) en modelos animales transgénicos para la EA. De manera relevante para esta tesis, se ha demostrado que el EO disminuye la fosforilación de la proteína Tau algunos sitios relacionados con la patología tipo EA

(Liao, Liu, & Zhu, 2012). Además, el EO induce que las interneuronas nuevas desarrollen mayor sensibilidad a los aromas familiares al incorporarse al BO (Cummings, Snyder, Brewer, Cameron, & Belluscio, 2014; Lepousez et al., 2014; Livneh et al., 2014) y favorece que las neuronas recién incorporadas sobrevivan y se integren al circuito bulbar (Alonso et al., 2008; Bovetti, Veyrac, Peretto, Fasolo, & De Marchis, 2009; Lledo & Lagier, 2006; Martončíková, Lievajová, Orendáčová, Blaško, & Račková, 2011; Shapiro et al., 2007). Finalmente, se ha identificado que el EO promueve la regeneración de interneuronas en el circuito del BO tras una lesión (Lazarini et al., 2014) y produce que las células Gr recién incorporadas incrementen su número conexiones sinápticas con las neuronas principales del BO (Cummings et al., 2014; Lepousez et al., 2014; Livneh et al., 2014). Estos hallazgos sustentan al EO como una estrategia potencialmente preventiva del efecto tóxico del  $\beta$ A sobre las neuronas Gr del BO. Por ello, nos propusimos estudiar el efecto del EO sobre la actividad eléctrica del BO y su posible papel preventivo de la inhibición de la actividad espontánea inducida por el  $\beta$ A<sub>1-42</sub> soluble.

### 3. Justificación

La EA es una enfermedad crónica-neurodegenerativa que incrementa conforme aumenta la esperanza de vida. Debido a que uno de los síntomas más tempranos de esta enfermedad es la hiposmia y a que ésta se asocia con la presencia de formas solubles del  $\beta$ A, se ha estudiado el efecto del péptido  $\beta$ A sobre la actividad eléctrica del BO. Datos obtenidos en el laboratorio han demostrado que el péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub> disminuye la potencia de la actividad espontánea del BO e induce deficiencia en la olfacción (Alvarado-Martínez et al., 2013). Sin embargo, poco se conoce acerca de estrategias conductuales que pudieran evitar este proceso patológico.

Un paradigma útil para este propósito es el EO, pues esta manipulación genera cambios plásticos en el circuito del BO que mejoran su función. Con base en lo anterior, nos planteamos las siguientes preguntas:

¿El EO modifica la actividad espontánea de la capa granular del BO?

¿El EO previene las alteraciones en la actividad espontánea del BO producidas por la aplicación del péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub>?

## 4. Hipótesis

El EO modifica la actividad del BO y previene la disminución de la misma producida por el péptido  $\beta A_{1-42}$  *in vitro*.

## 5. Objetivo general

Caracterizar la actividad del BO *in vitro* de ratones sometidos a EO y determinar su sensibilidad al efecto agudo del péptido  $\beta A_{1-42}$ .

### 5.1. Objetivos específicos

En ratones macho de la cepa CD-1 de 3 semanas de edad sometidos a enriquecimiento olfatorio durante 21 días o ratones de la misma edad sin enriquecimiento olfatorio:

- Evaluar la actividad espontánea *in vitro* de las neuronas granulares del BO mediante registros de PLC.
- Evaluar la afectación de esta actividad por el péptido  $\beta A_{1-42}$ .

En ratones macho de la cepa CD-1 de 11 semanas de edad sometidos a EO durante 21 días o ratones de la misma edad sin EO:

- Evaluar su capacidad olfatoria a través de las pruebas de habituación-deshabitación y la prueba de evitación olfatoria.
- Evaluar la actividad espontánea *in vitro* de las neuronas granulares del BO.
- Evaluar la afectación de esta actividad por el péptido  $\beta A_{1-42}$ .

## 6. Materiales y métodos

### 6.1. Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1 recién nacidos o de 8 semanas según el experimento a realizar. Los animales fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM y tuvieron acceso ilimitado a agua y alimento. Los animales se mantuvieron en un ciclo normal de luz/oscuridad (luz de 7–19 h) con temperatura y humedad controladas. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas del Comité de Bioética (número de

proyecto aprobado 91) del Instituto de Neurobiología de la UNAM y se evitó cualquier daño o sufrimiento innecesario de los animales.

## **6.2. Enriquecimiento olfatorio**

Se utilizó el protocolo de EO por 21 días descrito por Martončíková y colaboradores (2011). Para ello, se colocó un contenedor horadado que contenía hisopos (1-3 según el aroma) bañados a saturación con uno de 21 aromas diferentes durante una hora, dos veces al día (una hora por la mañana y una hora por la tarde), con al menos 3 horas de intervalo entre cada exposición.

Al grupo control (no enriquecido) se le colocó diariamente el contenedor sin hisopos de la misma forma que los animales EO. El aroma fue cambiado diariamente durante los 21 días y nunca se repitió alguno (Martončíková et al., 2011). Dado que el objetivo del experimento no fue asociar la presentación del aroma con algún otro estímulo, sino la exposición pasiva a cada uno de los aromas, no se eligieron horas fijas para la exposición olfatoria. Para evitar que el aroma se volatilizara dentro del cuarto del Bioterio, se utilizaron cajas con un sistema de ventilación independiente y cubiertas con un filtro.

Para la selección de aromas se realizó una búsqueda bibliográfica acerca de protocolos de EO previamente utilizados. Además, se seleccionaron aquellos aromas a los que se tuvo fácil acceso. Se utilizaron los siguientes aromas naturales y sintéticos sin diluir: eucalipto, albahaca, anís, canela, lavanda, hierbabuena, pino, limón, clavo, menta piperita americana, romero, mandarina, tomillo, salvia, *wintergreen*, toronja blanca, almendras dulces, acetato de amilo, heptaldehído, octanaldehído y citrol (componente aislado del limón).

Al finalizar la fase de EO se evaluó la capacidad olfatoria en los animales adultos (11 semanas). Las pruebas conductuales se llevaron a cabo en cuartos destinados para ello, los animales fueron manipulados por el mismo experimentador, se utilizaron guantes distintos para cada aroma y para colocar a los ratones en la caja de prueba. Durante la ejecución de las pruebas olfatorias y la duración del EO se evitó utilizar perfumes u otros productos odorantes que pudieran afectar los resultados de las pruebas.

## **6.3. Prueba de habituación-deshabitación**

Con la finalidad de evaluar si el EO altera la ejecución de tareas olfatorias se realizó la prueba de habituación-deshabitación, que evalúa la investigación de un aroma novedoso, la memoria del

mismo (habituaación) y la discriminación olfatoria (deshabituación) (Yang & Crawley, 2009). Para ello, se expuso al animal a un olor por 2 minutos en 3 ensayos sucesivos (un bloque) y se separó cada exposición por 1 minuto. Se usaron dos aromas distintos que no desencadenan aversión ni preferencia (vainilla y vinagre) (Root, Denny, Hen, & Axel, 2014). Con la finalidad de familiarizar a cada ratón con la tarea, el primer bloque consistió en 2 ensayos en los que se utilizó el agua destilada (Wesson et al., 2010; Yang & Crawley, 2009). En los ensayos posteriores, se utilizó alguno de los dos aromas.

Se cuantificó, durante la ejecución de la tarea, el tiempo de investigación, definido como el olfateo activo con la nariz orientada hacia la fuente del aroma y se consideró que la conducta terminó cuanto el ratón retiró su nariz del sitio donde proviene el aroma (Wesson et al., 2010; Yang & Crawley, 2009). La habituación se define como la disminución del tiempo de investigación como consecuencia de la repetición del mismo estímulo olfatorio (Wesson et al., 2010), mientras que la deshabituación consiste en el incremento en el tiempo de investigación ante un estímulo novedoso (discriminación) (Wesson et al., 2010; Yang & Crawley, 2009). La prueba se llevó a cabo durante la fase de luz del ciclo luz/oscuridad y se utilizó una caja de acrílico (27x17x12 cm) con aserrín limpio (para evitar la contaminación con otros aromas), cubierta con una rejilla y una malla delgada sobre la cual se colocaron recipientes circulares metálicos (4.5 cm de circunferencia) con un cuadro de papel filtro (2x2 cm) que contenía 10 µl del aroma para el bloque correspondiente.

#### **6.4. Prueba de evitación olfatoria**

Con la finalidad de evaluar si el EO tiene un efecto en la detección de un aroma aversivo se realizó la prueba de evitación olfatoria (Cho, Prince, Cutforth, & Cloutier, 2011; Lazarini et al., 2014). Para ello se utilizó 2,4,5-Trimetiltiazol (TMT), un odorante volátil presente en las heces del zorro que produce una conducta innata de evitación en los roedores (Cho et al., 2011; Lazarini et al., 2014). El análisis se realizó fuera de línea. Para ello, se utilizaron dos separadores en la pantalla de proyección del video para dividir la caja en tres compartimentos equidistantes y se cuantificó el tiempo que el animal permaneció en cada tercio.

La prueba consta de cuatro fases. En la primera, se coloca al ratón en una caja sin aserrín con las mismas dimensiones que la caja prueba (47x25.5x21 cm) durante 10 minutos, con el propósito de que se familiarice con la caja y con el cuarto de la prueba. En la segunda fase, se

colocó al animal en la caja de prueba con fines de habituación. En la tercera fase (pre-prueba), se adhirieron 2 papeles filtro (2x2 cm) en cada compartimento externo de la caja con 5 µl de agua destilada, esta fase duró 3 minutos. Después de 5 minutos, se procedió con la cuarta fase de la prueba, en la que se dispusieron ambos papeles filtro, uno con agua destilada y el otro con 2,4,5-Trimetiltiazol (TMT) al 10% con agua destilada como vehículo (Cho et al., 2011; Lazarini et al., 2014). Una hora después, se repitió la prueba utilizando el aroma aversivo (TMT) concentrado al 50% (Buron et al., 2007). El compartimento que contenía el TMT se denominó zona 1, el compartimento opuesto (más alejado del TMT), que contenía el vehículo se llamó zona 3 y el central zona 2 (Lazarini et al., 2014). Se evaluó el índice de preferencia por separado para cada concentración de TMT mediante la sustracción del tiempo de permanencia en el cuadrante con TMT al tiempo de permanencia en ese cuadrante durante la fase de pre-prueba (Lazarini et al., 2014).

### **6.5. Obtención de rebanadas de bulbo olfatorio**

Al día siguiente de las pruebas olfatorias, se practicó una eutanasia a los animales mediante la administración de pentobarbital sódico (63 mg/Kg), con el objetivo de obtener rebanadas de BO. Posteriormente, se realizó una perfusión intracardiaca con una solución protectora que contenía (en mM): 238 sacarosa, 3 KCl, 30 NaHCO<sub>3</sub>, 30 glucosa, 0.7 CaCl<sub>2</sub> y 2.5 MgCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y pH 7.4 gaseada con carbógeno (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) y mantenida a 4°C. Después de la perfusión, los animales fueron decapitados para obtener el encéfalo. Se extrajeron ambos BOs y se colocaron en un bloque de agarosa con una inclinación de 30° sumergidos en una solución de líquido cerebrospinal (LCE) artificial oxigenado (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) a 4 °C que contiene, en mM, 119 NaCl, 30 glucosa, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 3 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.5 CaCl<sub>2</sub> y pH 7.4. Se obtuvieron rebanadas transversales de BO de 400 µm con el uso un vibratomo y se colocaron en una cámara de incubación con LCE artificial oxigenado a temperatura ambiente durante al menos 1 h, durante este tiempo, las células que se encuentran en la rebanada restablecen su actividad metabólica, lo que favorece que los experimentos se lleven a cabo con actividad estable (Varela, Llano, & Theyel, 2011).

### **6.6. Registros de potenciales locales de campo**

Para identificar el efecto *in vitro* de la proteína βA sobre la actividad eléctrica de la capa Gr del BO de ratones EO o animales control (no enriquecidos), se realizaron los registros de PLC en

rebanadas de BO (Alvarado-Martínez et al., 2013 y Alvarado-Martínez, 2012). Para ello, se utilizó una cámara de registro con LCE artificial gasificado con carbógeno y mantenido entre 30 y 32°C. Se colocó la rebanada en la cámara de registro y allí se colocó un electrodo de borosilicato con una resistencia de 0.5-1.0 MΩ en la capa granular. Como se mostró previamente, esta capa es la más interna y la de mayor área en el BO de los roedores, misma que se encuentra debajo de la capa mitral formada por una hilera visible y ordenada de somas neuronales (Figura 2 A). Se registró la actividad espontánea poblacional de las Gr del BO, en la condición basal (se requirió que la actividad espontánea fuera estable durante al menos 20 min) y, posteriormente, se aplicó  $\beta A_{1-42}$  (30 nM) en la solución de registro (el registro se mantuvo durante 60 min). Por último, se corroboró la actividad biológica de la rebanada colocando lidocaína (1 mM) en la solución de registro (el efecto de lidocaína se registró durante 10 min) (Alvarado-Martínez, 2012). La lidocaína bloquea los canales de  $Na^+$  lo que deprime el disparo neuronal y la actividad sináptica (Schurr et al., 1986). Un fármaco análogo a la lidocaína es la tetrodotoxina que ha sido ampliamente utilizada para diferenciar los sinápticos espontáneos del ruido eléctrico en registros unicelulares (Alonso et al., 2008). Además, la aplicación de lidocaína es una buena estrategia para discernir la señal “biológica” del ruido eléctrico, debido a que ambas señales se encuentran en el rango de los  $\mu V$  (Peña et al., 2010). Cabe mencionar que la disminución del 50% de la actividad registrada durante la aplicación de lidocaína fue un criterio de inclusión para los experimentos. La señal fue adquirida con una frecuencia de muestreo de 1.25 kHz (una muestra cada 800  $\mu s$ ), con un amplificador de corriente alterna con filtros de 0.75 a 750 Hz, digitalizada y almacenada en una computadora para su posterior análisis fuera de línea.

### **6.7. Oligmerización del péptido $\beta A$**

Datos obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que los oligómeros solubles de la  $\beta A$  constituyen la forma más potente con respecto a la disminución de la actividad de los circuitos neuronales (Balleza-Tapia, Huanosta-Gutiérrez, Márquez-Ramos, Arias, & Peña-Ortega, 2010). Se oligomerizó al  $\beta A$  con un protocolo previamente estandarizado (Lambert et al., 1998). Para ello el péptido  $\beta A$  se incubó con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) a una concentración final del péptido de 1 mM por 60 min, a temperatura ambiente. La solución fue posteriormente evaporada para remover todo el HFIP durante un periodo de aproximadamente 18 h. Acto seguido, el péptido se resuspendió a una concentración 5 mM en DMSO al 100 % y posteriormente se diluyó en medio F12 (sin rojo fenol) a una concentración final de 100  $\mu M$ . Esta

solución se incubó por 24 h de 4 a 5 °C y se centrifugó, a la misma temperatura, a 14,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante que contiene oligómeros y monómeros de  $\beta$ A se colocó en alícuotas con 30  $\mu$ l y se usó directamente en los experimentos (Balleza-Tapia, 2014). Las alícuotas se mantuvieron en refrigeración a 4°C con la finalidad de evitar que los oligómeros formaran fibrillas (Balleza-Tapia, 2014).

## **6.8. Análisis de resultados**

### **6.8.1. Evaluaciones conductuales**

Para la prueba de habituación-deshabituación se cuantificó el tiempo de investigación de la fuente del olor en cada bloque (Yang y Crawley, 2009; Wesson et al, 2010). Con la finalidad de evaluar las diferencias entre los ensayos y los grupos, se realizó un ANOVA de dos vías con una  $p < 0.05$ .

Para la prueba de evitación olfatoria se cuantificó el tiempo de permanencia en cada compartimento de la caja de prueba en ambas fases, pre-prueba y prueba, y se realizó un “*raster plot*”. A partir de éste, se cuantificó la permanencia de cada animal en cada tercio (zona 1, 2 y 3). Con la finalidad de identificar si el tiempo de permanencia del animal en cada tercio de la caja era distinto, se realizó una prueba no paramétrica (Friedman y la prueba *post hoc* de Dunn) con una  $p < 0.05$ . Se calculó el índice de preferencia mediante la sustracción del tiempo invertido en la zona 1 durante la prueba con TMT menos el tiempo invertido en el mismo compartimento durante la pre-prueba (Lazarini et al., 2014). Para evaluar diferencias en el índice de preferencia, se realizó una prueba no paramétrica para dos muestras independientes (U de Mann Whitney) con una  $p < 0.05$ , donde se comparó el grupo control (no enriquecido) y el grupo enriquecido expuesto a cada concentración de TMT al 10% o al 50%.

### **6.8.2. Registros electrofisiológicos**

Los registros de PLC fueron analizados fuera de línea utilizando el programa ClampFit 10.4. La señal fue descompuesta mediante la Transformada Rápida de Fourier por con una ventana tipo Hamming que ha sido usada previamente para el análisis de este tipo de datos (Constantinou, Elijah, Squirrell, Gigg, & Montemurro, 2015; Michail, Dresel, Witkovský, Stankewitz, & Schulz, 2016; van Wingerden, Vinck, Lankelma, & Pennartz, 2010). Esta ventana es útil para suavizar la discontinuidad al inicio y al final de una señal muestreada (Smith, 2011).

Para el seguimiento temporal de la actividad espontánea en las distintas condiciones experimentales, se obtuvieron tres ventanas de 5 s cada 10 min y se promediaron. Con ello, se obtuvo la potencia total en el rango de 1 a 60 Hz que incluye las bandas de frecuencia antes descritas en el BO theta ( $\theta$ , 2-12 Hz); beta ( $\beta$ , 15-30 Hz) y gamma lenta ( $\gamma$ , 40-60 Hz) (Kay, 2014, 2015) mismas que aportan la mayor proporción de potencia en el PLC del BO (Alvarado-Martínez, 2012).

Cada experimento tuvo una duración total de 90 min (20 min actividad basal estable, 60 min en  $\beta$ A y 10 min en lidocaína). La potencia promedio fue normalizada con respecto a los 20 min de actividad basal estable. Los resultados fueron normalizados al valor correspondiente a los 20 min de actividad basal estable (considerados como 100 %) y se muestran en gráficas de caja y bigote. Se utilizó una prueba de Friedman y una *post hoc* de Dunn con una  $p < 0.05$ . Los resultados se muestran en mediana, rangos intercuartilares (1 y 3) y rango (máximo y mínimo).

La frecuencia pico fue comparada en cada grupo entre el tiempo basal y 60 min después para cada condición, para esto se utilizó una prueba no paramétrica pareada (Wilcoxon), mientras que para comparar la frecuencia pico entre grupos distintos, se utilizó una prueba no paramétrica para muestras independientes (U de Mann Whitney).

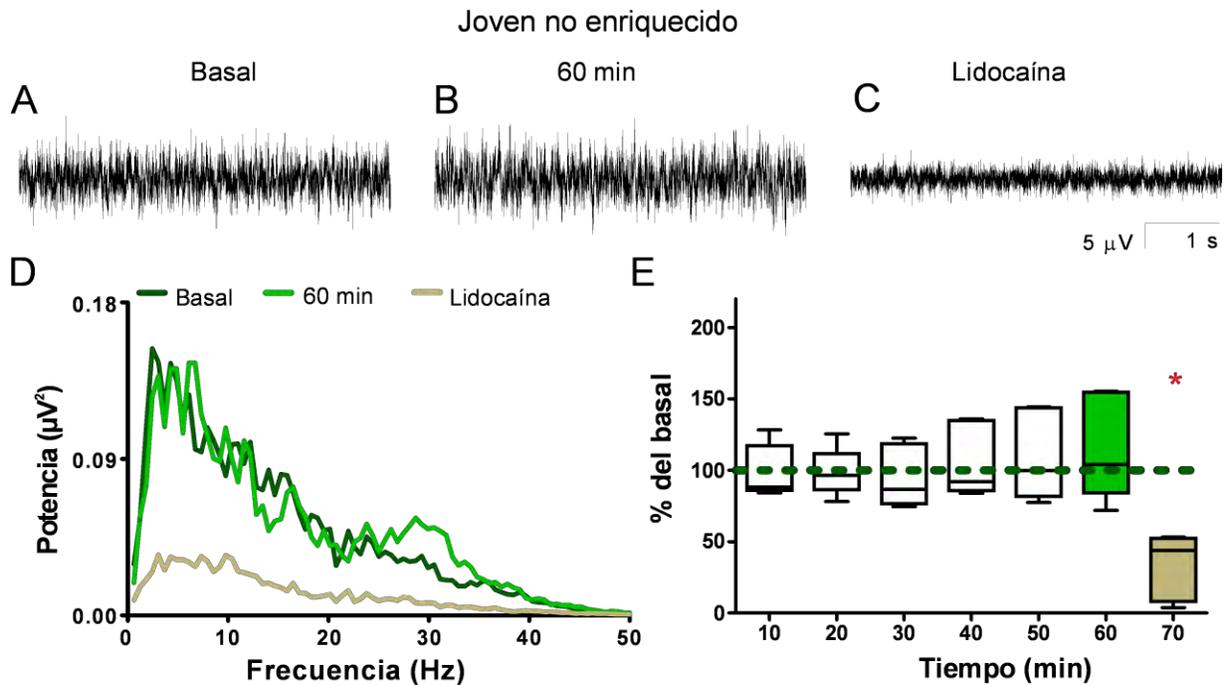
Se utilizó el programa R studio para el análisis de la potencia relativa. Ésta se obtuvo a partir de la normalización de la potencia integrada de la actividad espontánea basal de 1 a 60 Hz para cada registro. Se comparó la condición basal del grupo control y del grupo EO para cada edad (3 y 11 semanas) de forma independiente, así como la condición basal de los jóvenes y los adultos, para ello se realizó una prueba t de muestras independientes para cada frecuencia con una  $p < 0.05$  y se utilizó una corrección de falso descubrimiento para evitar falsos positivos.

## 7. Resultados

### 7.1. Evaluación de la actividad espontánea y del efecto del péptido $\beta$ A en rebanadas de bulbo olfatorio animales jóvenes

#### 7.1.1. Evaluación de la viabilidad funcional de rebanadas de bulbo olfatorio de ratones jóvenes

Los primeros resultados muestran que las rebanadas de BO de ratones jóvenes mantienen los mismos niveles de actividad espontánea poblacional de la capa granular por al menos 80 minutos de registro continuo (ver sección 6.8.2), lo que indica que la actividad espontánea es estable y que puede atribuirse a actividad neuronal (Peña-Ortega et al., 2010). Estos registros se realizaron con la finalidad de estandarizar la técnica de registro de PLC, además, constituyeron una fase preparatoria para los registros de los animales experimentales.



**Figura 5** La actividad espontánea de la capa granular del bulbo olfatorio de animales jóvenes es estable a lo largo del protocolo de experimentación

A-C: trazos representativos en tres fases del experimento; A: basal, B: 60 minutos de registro continuo y C: aplicación de lidocaína. En D se muestran los espectros de potencia promedio de las 3 condiciones representadas en A-C. El espectro promedio control se representa en verde oscuro; el espectro promedio a los 60 minutos de registro continuo se representa en verde limón y el espectro promedio en presencia de lidocaína se representa en café. E porcentaje de la potencia con respecto a la actividad basal después de 20 min de registro estable a lo largo de tiempo en rebanadas de animales jóvenes control ( $n=5$ ) y la inhibición de la misma con lidocaína (1 mM). La línea punteada verde oscuro corresponde al 100% de la actividad basal determinada a los 20 min de actividad estable. Note que la potencia de la actividad del BO se mantiene estable a lo largo del registro. \* señala una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.02$ ), con respecto a la actividad basal (Friedman=15.80). La línea dentro de la caja representa la mediana, los bordes el cuartil 1 y 3 y los bigotes el rango (mínimo y máximo).

Para hacer el análisis cuantitativo de estos registros se obtuvo un espectro de potencia de los mismos (Figura 5 D). La potencia total entre 1 y 60 Hz fue integrada y normalizada con respecto a la actividad basal, determinada a los 20 min de actividad estable para cada rebanada, y se evaluó la secuencia temporal del experimento (Figura 5 E). Se encontró que la potencia de la actividad espontánea de las neuronas Gr del BO (n=5) no se modifica durante al menos 80 minutos de registro ( $116.00 \pm 16.49\%$  del control) y que la actividad neuronal solo se inhibe farmacológicamente con lidocaína ( $32.96 \pm 10.31\%$  del control) (Friedman=15.80;  $p=0.02$ ).

Al realizar la cuantificación de la frecuencia pico de la actividad de las rebanadas control, definida como la frecuencia predominante durante el registro del PLC (Alvarado-Martínez, 2012; Balleza-Tapia et al., 2010), se encontró que durante la actividad basal la frecuencia predominante es de  $4.88 \pm 2.89$  Hz, la cual no se modificó después 60 minutos de registro continuo ( $4.15 \pm 1.97$  Hz) (Wilcoxon=3;  $p=0.25$ ).

### **7.1.2. Efecto del $\beta A_{1-42}$ en el bulbo olfatorio del ratón joven**

Una vez que se obtuvieron rebanadas con actividad espontánea estable de las neuronas Gr del BO, se registró un grupo independiente de rebanadas para evaluar el efecto del péptido  $\beta A_{1-42}$  a 30 nM (Figura 6).

El  $\beta A_{1-42}$  reduce la potencia de actividad espontánea de las neuronas Gr del BO paulatinamente, hasta alcanzar a los 60 min de exposición  $44.75 \pm 6.04\%$  con respecto al basal ( $p<0.05$ ). Posteriormente, la actividad neuronal se abole con lidocaína y la potencia se reduce a  $18.90 \pm 6.04\%$  con respecto al basal ( $p<0.001$ ) (Friedman=31.19). Estos datos concuerdan con lo hallado previamente en el laboratorio (Alvarado-Martínez; 2012). Al realizar la cuantificación de la frecuencia pico, se encontró que durante la actividad basal la frecuencia predominante es  $7.84 \pm 1.96$  Hz, la cual no se modificó significativamente después de la aplicación de  $\beta A_{1-42}$  ( $7.58 \pm 1.16$  Hz) (Wilcoxon=3,  $p=0.42$ ).

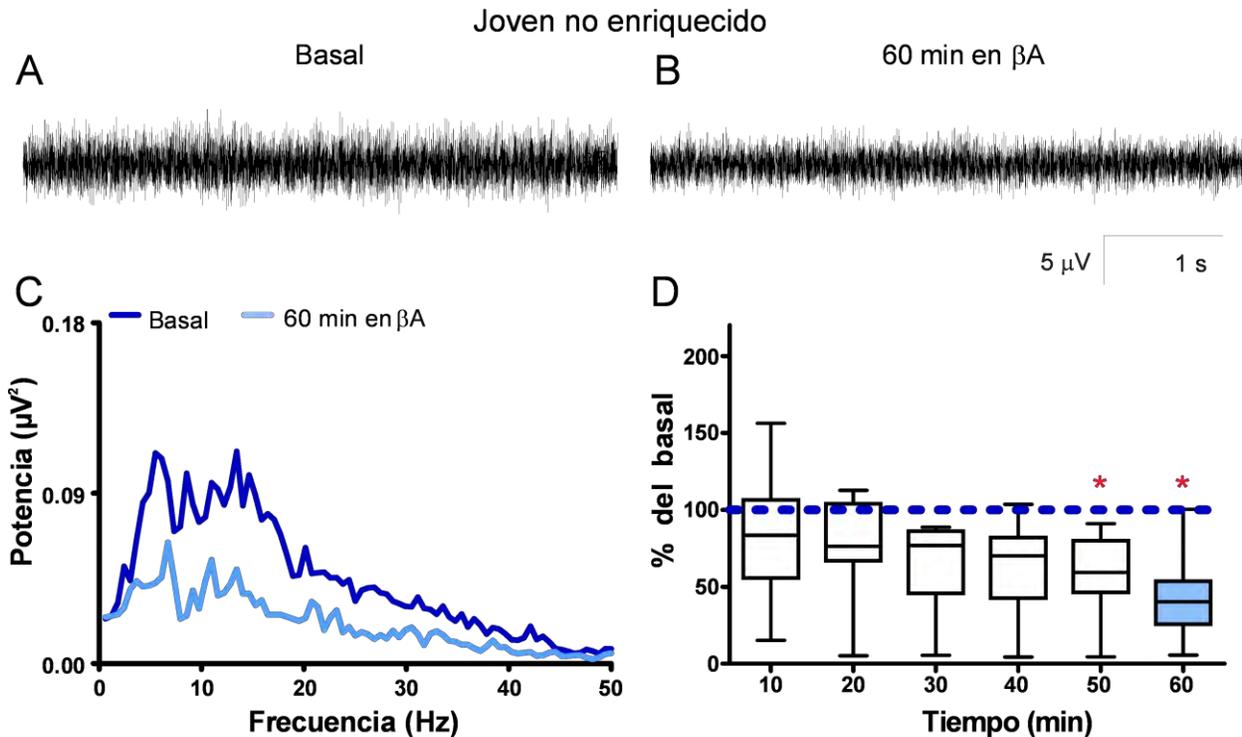


Figura 6 El péptido  $\beta A$  disminuye la actividad espontánea de la capa granular del bulbo olfatorio

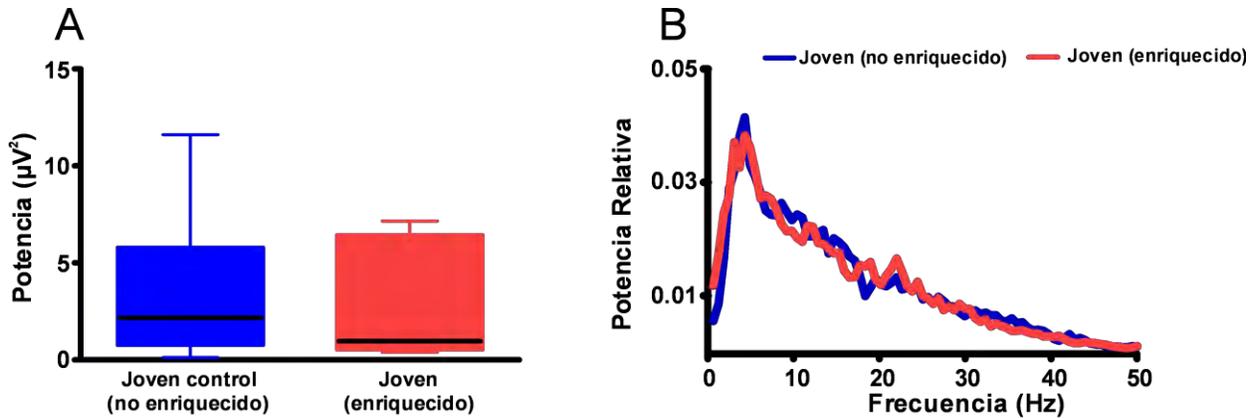
A y B: trazos representativos en dos fases del experimento; A: basal, B: después de 60 minutos de la aplicación de  $\beta A_{1-42}$ . C: espectros de potencia promedio que corresponden a las 2 condiciones representadas en A y B. En azul rey se muestra el espectro promedio basal y en azul cielo después de 60 minutos de  $\beta A_{1-42}$ . D: porcentaje de la potencia del BO con respecto a 20 min de la actividad basal estable (línea punteada azul rey) a lo largo del experimento en rebanadas de animales no enriquecidos ( $n=7$ ). Note que la potencia de la actividad del BO disminuye a lo largo del registro. \* señala una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), con respecto a la actividad basal (Friedman=31.19). La línea dentro de la caja representa la mediana, los bordes el cuartil 1 y 3 y los bigotes el rango (mínimo y máximo).

### 7.1.3. Efecto del enriquecimiento olfatorio en la actividad espontánea del bulbo olfatorio de animales jóvenes

Con el objetivo de identificar si el EO modifica la actividad espontánea de las neuronas Gr del BO de animales jóvenes, se cuantificó la potencia total de la actividad eléctrica de rebanadas de animales tanto enriquecidos como no enriquecidos (Figura 7).

La potencia integrada de la actividad de las rebanadas de animales control (no enriquecidos, barra azul;  $n=7$ ) fue de  $3.46 \pm 1.54 \mu V^2$ , mientras la potencia integrada de la actividad de las rebanadas de animales EO (barra coral;  $n=7$ ) fue de  $2.57 \pm 1.11 \mu V^2$ . Los valores de potencia obtenidos no son significativamente diferentes (U de Mann Whitney=21;  $p=0.35$ ) (Figura 7 A). El análisis de la potencia relativa para cada valor de frecuencia entre las rebanadas de animales control (no enriquecidos, línea azul) y las rebanadas de animales enriquecidos (línea coral) no muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ). Por lo tanto, el EO no

modifica la potencia de la actividad espontánea de las neuronas de BO de animales jóvenes (Figura 7).

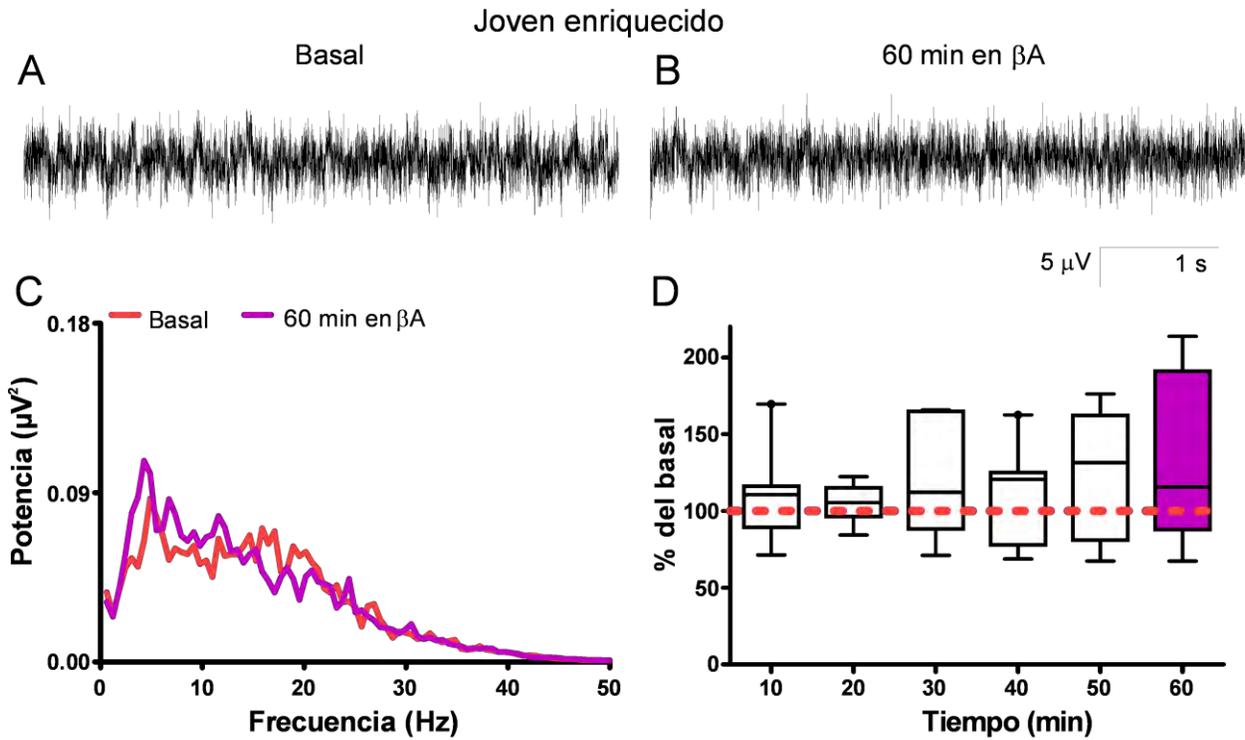


**Figura 7** El enriquecimiento olfatorio no modifica la actividad espontánea de las neuronas granulares del bulbo olfatorio en animales jóvenes

**A** Cuantificación de la potencia de la actividad basal del bulbo olfatorio de rebanadas obtenidas de animales control (no enriquecidos; barra azul; n=7) y de animales enriquecidos olfatoriamente (coral; n=7; U de Mann Whitney=21; p=0.35). Datos mostrados en mediana, rangos intercuartiles (25 y 75) y rango (máximo y mínimo). **B** Espectro de la potencia relativa de la actividad de rebanadas obtenidas de animales control se representa en color azul y la potencia relativa de la actividad de rebanadas obtenidas de animales enriquecidos en color coral. Datos mostrados en media.

#### 7.1.4. Efecto del $\beta A_{1-42}$ en el bulbo olfatorio del ratón joven enriquecido

Al probar si el EO puede prevenir el efecto inhibitorio de la actividad espontánea de las neuronas Gr del BO inducido por 30 nM de  $\beta A_{1-42}$  (Figura 8), se observó que los espectros de potencia de la actividad del bulbo olfatorio obtenidos de la condición basal (coral) y 60 minutos en  $\beta A_{1-42}$  (morado) no son diferentes (Figura 8 C). Esto se traduce en que el  $\beta A_{1-42}$  no reduce la potencia de la actividad espontánea del BO ( $131.50 \pm 17.84$  % con respecto a la actividad basal) (n=7) (Figura 8 D). La actividad neuronal se abole con lidocaína y la potencia se reduce a  $21.77 \pm 5.28$  % con respecto a la actividad basal (p<0.01) (Friedman=18.90; p<0.0001) (Figura 8). Durante la actividad basal, la frecuencia predominante es de  $6.19 \pm 2.11$  Hz, la cual no se modificó significativamente después la aplicación de  $\beta A_{1-42}$  ( $6.88 \pm 2.64$  Hz) (Wilcoxon=1.00; p=0.50). Lo que permite sugerir que el EO previene el efecto inhibitorio de la actividad espontánea de las neuronas Gr del BO.



**Figura 8** El enriquecimiento olfatorio evita la inhibición de la actividad espontánea de la capa granular de rebanadas de bulbo olfatorio producida por el  $\beta A_{1-42}$

**A y B:** trazos representativos en dos fases del experimento; **A:** basal, **B:** después de 60 minutos de la aplicación de  $\beta A_{1-42}$ . En **C** se muestran los espectros de potencia promedio que corresponden a las 2 condiciones representadas en **A** y **B**. El espectro basal se representa en coral y después de 60 minutos en  $\beta A_{1-42}$  se representa en morado. **D** se grafica el porcentaje de la actividad con respecto a la basal a lo largo de tiempo en rebanadas de animales enriquecidos ( $n=7$ ). Note que la potencia de la actividad del BO se mantiene estable a lo largo del registro. La línea dentro de la caja representa la mediana sus bordes el cuartil 1 y 3 y los bigotes mínimo y máximo.

Esta serie de resultados permite resumir que, como se había demostrado previamente (Alvarado-Martínez, 2012); el péptido  $\beta A_{1-42}$  tiene un efecto inhibitorio en la actividad eléctrica de las neuronas Gr del BO y que éste puede evitarse en animales jóvenes (3 semanas), mediante el EO.

## 7.2. Evaluación de la actividad espontánea y el efecto del péptido $\beta A$ en rebanadas de animales adultos

### 7.2.1. Evaluación de la viabilidad funcional de rebanadas de bulbo olfatorio de animales adultos

La siguiente pregunta fue evaluar si el EO era útil para evitar el efecto del  $\beta A_{1-42}$  en animales adultos. Previo a encaminarse a eso, se corroboró la viabilidad funcional de las rebanadas de animales de 11 semanas.

Para ello se realizaron registros con duración de 90 min en rebanadas de animales control no enriquecido (NE) (Figura 9). La potencia total entre 1 y 60 Hz fue integrada y normalizada con respecto a los 20 min de actividad basal estable y se evaluó la secuencia temporal del experimento (Figura 9 E).

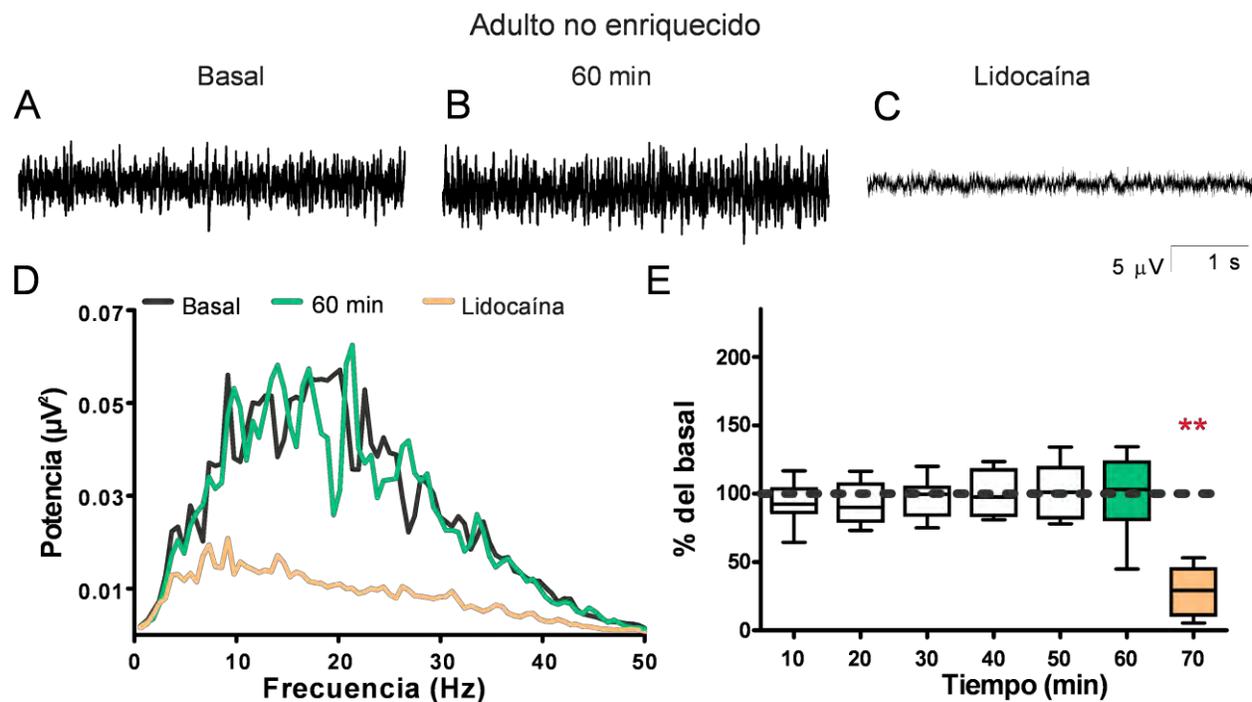


Figura 9 La actividad espontánea de la capa granular del bulbo olfatorio de animales adultos es estable a lo largo del protocolo de experimentación

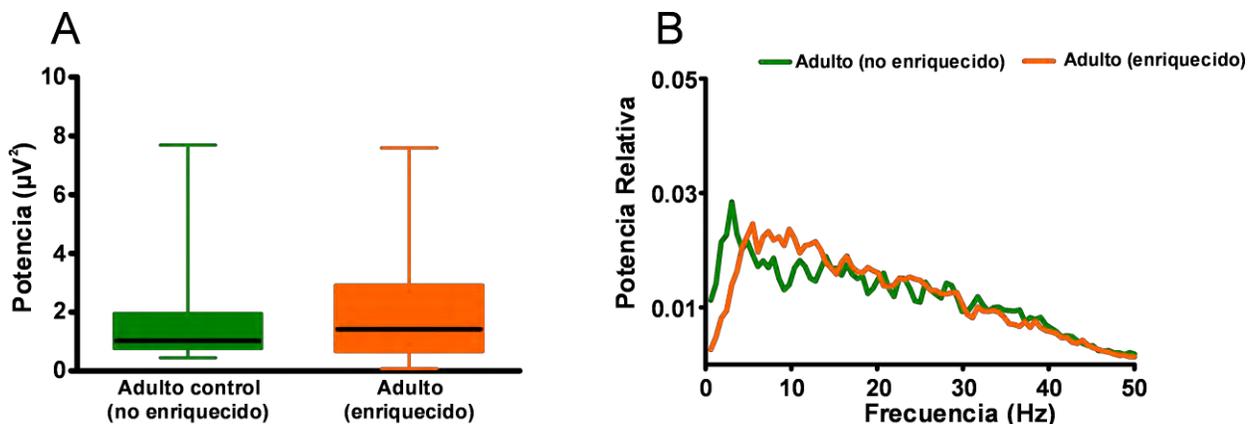
A-C: trazos representativos en tres fases del experimento; A: basal, B: 60 minutos de registro continuo y C: aplicación de lidocaína. En D se muestran los espectros de potencia promedio de las 3 condiciones representadas en A-C. El espectro promedio basal se representa en gris oscuro; el espectro promedio a los 60 minutos de registro continuo se representa en verde y el espectro promedio en presencia de lidocaína se representa en naranja. E porcentaje la potencia con respecto a la actividad basal a lo largo de tiempo en rebanadas de animales control (n=9) y una inhibición de la misma con lidocaína. Note que la potencia de la actividad del BO se mantiene estable a lo largo del registro. \* señala una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ), con respecto al control (Friedman=27.09). La línea dentro de la caja representa la mediana sus bordes el cuartil 1 y 3 y los bigotes el rango (mínimo y máximo).

Se encontró que la potencia de la actividad espontánea de las neuronas Gr del BO (n=9) no se modifica durante al menos 80 minutos de registro ( $99.98 \pm 9.27$  % de la actividad basal) y que la actividad neuronal se inhibe por la aplicación de la lidocaína ( $28.21 \pm 5.90$  % de la actividad basal) (Friedman=27.09;  $p < 0.001$ ) (Figura 9 E). Al realizar la cuantificación de la frecuencia pico, se encontró que durante la actividad basal la frecuencia predominante es de  $13.70 \pm 1.53$  Hz, la cual no se modificó significativamente después de 80 minutos de registro continuo ( $13.70 \pm 1.46$  Hz) (Wilcoxon=-3;  $p=0.44$ ).

Con este experimento se confirma que la actividad espontánea de las neuronas Gr se mantiene estable durante el registro.

### 7.2.2. Efecto del enriquecimiento olfatorio en la actividad espontánea del bulbo olfatorio del ratón adulto *in vitro*

Con el objetivo de identificar si el EO modificaba la actividad espontánea de las neuronas Gr del BO de animales adultos se cuantificó la potencia total de la actividad eléctrica de rebanadas de los grupos control-no enriquecido y enriquecido.



**Figura 10** El enriquecimiento olfatorio no modifica la potencia ni los componentes de frecuencia de la actividad espontánea de las neuronas granulares del bulbo olfatorio

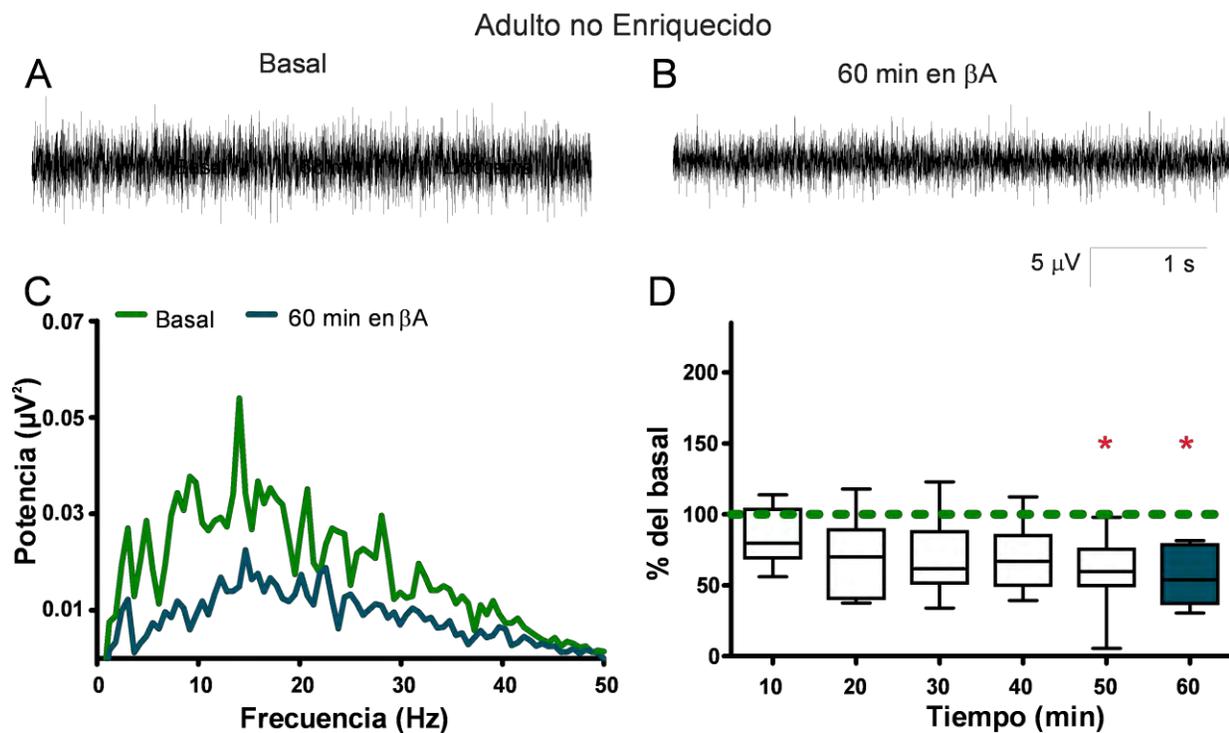
**A** Cuantificación de la potencia de la actividad basal del bulbo olfatorio de rebanadas obtenidas de animales control (No enriquecidos) (barra verde; n=8) y de animales enriquecidos olfatoriamente (anaranjado; n=10) (U de Mann Whitney=38;  $p=0.44$ ). Datos mostrados en mediana, cuartil 25 y 75, máximo y mínimo. **B** Media de la potencia relativa de la actividad de los mismos grupos experimentales. Datos mostrados en media.

Se registró un valor de potencia en las rebanadas de animales control-no enriquecidos (barra verde; n=8) de  $1.92 \pm 0.84 \mu V^2$  que es similar al obtenido de rebanadas de animales EO  $2.14 \pm 0.70 \mu V^2$  (barra anaranjada; n=10) (U de Mann-Whitney=38;  $p=0.44$ ) (Figura 10 A). El cálculo de la potencia relativa de la actividad de las neuronas Gr para cada valor de frecuencia

entre las rebanadas de animales control (no enriquecidos, línea verde) y las rebanadas de animales enriquecidos (línea anaranjada) no muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ) (Figura 10 B). El EO no modifica la potencia de la actividad espontánea de las neuronas de BO.

### 7.2.3. Efecto del $\beta A_{1-42}$ en el bulbo olfatorio del ratón adulto

Después de haber confirmado que las rebanadas de animales de 11 semanas tienen actividad eléctrica estable y es confiable para ser registrada, nos enfocamos en evaluar el efecto del péptido  $\beta A_{1-42}$ .



**Figura 11 El  $\beta A_{1-42}$  péptido inhibe la actividad espontánea de las neuronas granulares del bulbo olfatorio de animal adulto**  
Trazos representativos de la actividad espontánea del bulbo olfatorio de animales no enriquecidos (A y B). A corresponden al registro basal, mientras que B corresponde a la actividad espontánea una hora después de la aplicación continua de  $\beta A$  (60 min en  $\beta A$ ). C Media de los espectros de potencia de la actividad espontánea de animales control (n=8). D Porcentaje de la potencia de la actividad espontánea del bulbo olfatorio con respecto a la actividad control. \* representa una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la actividad basa (Friedman=32.33). La línea dentro de la caja representa la mediana sus bordes el cuartil 1 y 3 y los bigotes mínimo y máximo.

Como se encontró previamente en el laboratorio (Alvarado-Martínez, 2012), el  $\beta A_{1-42}$  reduce la potencia de actividad espontánea de las neuronas Gr del BO, 60 minutos después de la aplicación del  $\beta A_{1-42}$  se registró una reducción de la actividad espontánea del  $50.98 \pm 6.58\%$  con respecto a la actividad basal (barra azul; n=8) (Friedman=32.33,  $p<0.05$ ) (Figura 11 D). La

actividad poblacional se reduce aún más con lidocaína ( $29.33 \pm 5.05\%$  con respecto a la actividad basal,  $p < 0.001$ ) (Friedman=32.33) (dato no mostrado).

La frecuencia pico durante la actividad basal es de  $9.23 \pm 2.47$  Hz, la cual no se modificó significativamente después de la aplicación de  $\beta A_{1-42}$  ( $8.92 \pm 2.62$  Hz) (Wilcoxon=1;  $p=0.5$ ).

#### 7.2.4. Efecto del $\beta A_{1-42}$ en el bulbo olfatorio del ratón adulto enriquecido

Se evaluó si el EO evita el efecto inhibitorio del péptido  $\beta A_{1-42}$  (Figura 12). El tratamiento con  $\beta A_{1-42}$  no reduce la potencia total de la actividad espontánea del BO de animales adultos EO ( $119.40 \pm 17.23\%$  con respecto a la actividad basal,  $p < 0.05$ ) (Friedman=29.90) (11 semanas;  $n=10$ ) (Figura 12 D). La lidocaína reduce significativamente la potencia de la actividad ( $26.82 \pm 5.86\%$  con respecto a la actividad basal) (Friedman 29.90,  $p < 0.01$ ) (Figura 12 D).

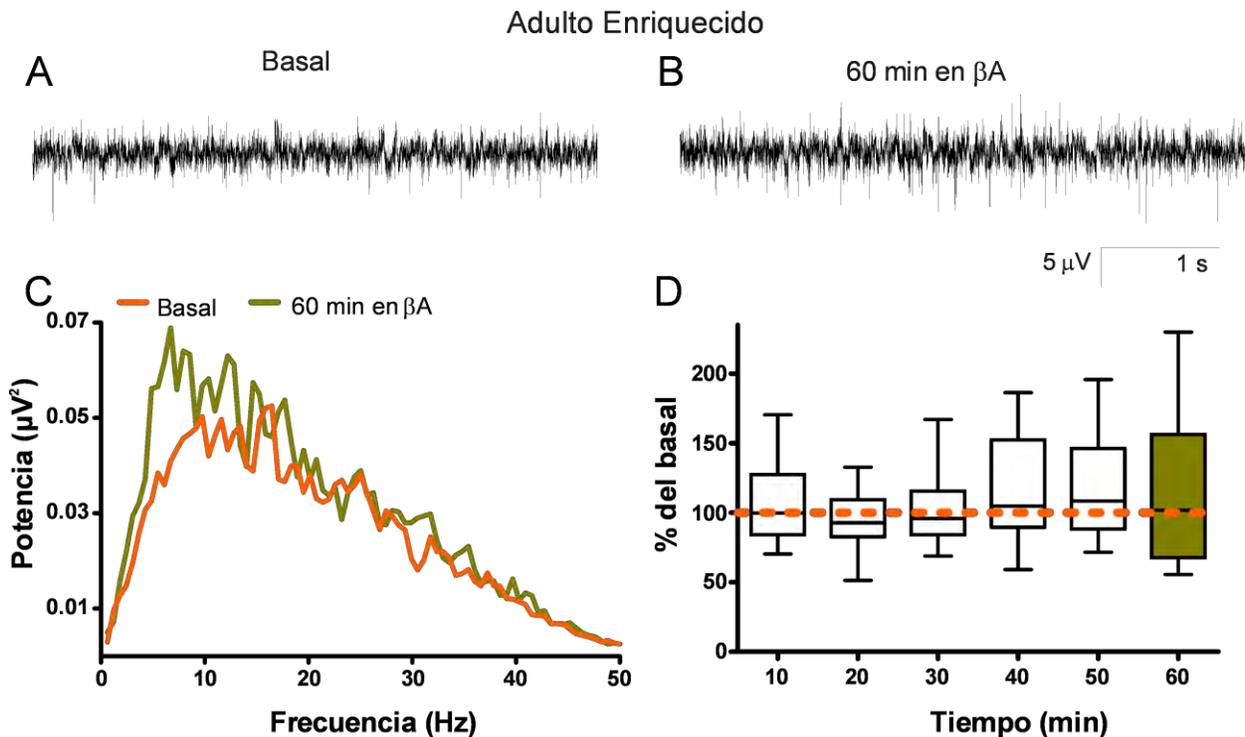


Figura 12 El enriquecimiento olfatorio evita la inhibición de la actividad espontánea de las neuronas granulares del bulbo olfatorio inducida por el  $\beta A_{1-42}$

**A** y **B**: trazos representativos en dos fases del experimento; **A** basal, **B** después de 60 minutos de la aplicación de  $\beta A_{1-42}$ . **C** espectros de potencia promedio que corresponden a las 2 condiciones representadas en **A** y **B**. El espectro de potencia basal se representa en anaranjado y 60 minutos después del  $\beta A_{1-42}$  en dorado. **D** porcentaje de la potencia con respecto al basal a lo largo del tiempo en rebanadas de animales adultos enriquecidos ( $n=10$ ). Note que el  $\beta A_{1-42}$  no reduce la actividad espontánea. La línea dentro de la caja representa la mediana sus bordes el cuartil 1 y 3 y los bigotes mínimo y máximo.

Al realizar la cuantificación de la frecuencia predominante, se encontró que durante la actividad basal ésta es de  $11.66 \pm 1.88$  Hz, la cual no se modificó significativamente después de la aplicación de  $\beta A_{1-42}$  ( $10.62 \pm 1.79$  Hz) (Wilcoxon= -1;  $p=0.5$ ).

Se observó que los espectros de potencia de la condición basal y el obtenido 60 min después de la exposición continua de  $\beta A_{1-42}$  (Figura 12 C) no son distintos, lo que sugiere que el EO previene el efecto inhibitorio de la actividad espontánea de las neuronas Gr del BO.

### 7.3. Evaluación de la actividad espontánea del bulbo olfatorio con respecto a la edad

La potencia integrada de la actividad de las rebanadas de animales control jóvenes (azul;  $n=7$ ) fue de  $3.46 \pm 1.54 \mu V^2$  mientras que para las rebanadas de animales control adultos (verde;  $n=8$ ) fue de  $1.92 \pm 0.84 \mu V^2$ . Los valores de potencia obtenidos no son significativamente diferentes (U de Mann Whitney=25;  $p=0.38$ ) (Figura 13 A). El análisis de la potencia relativa para cada valor de frecuencia entre el grupo joven (no enriquecidos, línea azul) y el grupo adulto (línea verde) no es estadísticamente significativo ( $p>0.05$ ) (Figura 13 B).

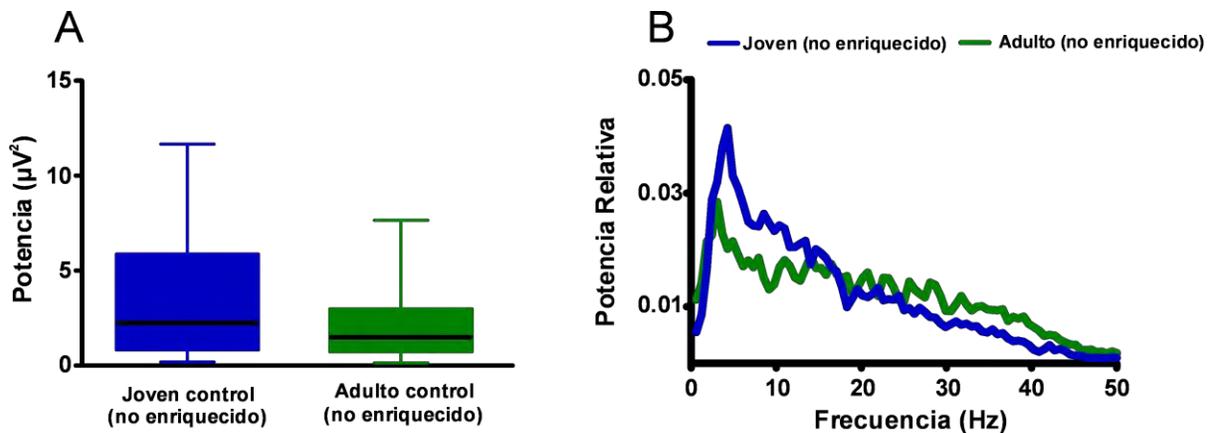


Figura 13 La actividad basal del bulbo olfatorio no se modifica con la edad

A Cuantificación de la potencia de la actividad basal del bulbo olfatorio de rebanadas obtenidas de animales control jóvenes (barra azul;  $n=7$ ) y adultos (no enriquecidos) (verde;  $n=8$ ) (U de Mann Whitney=25; 0.38. La línea dentro de la caja representa la mediana sus bordes el cuartil 1 y 3 y los bigotes mínimo y máximo. B Media de la potencia relativa de la actividad de los mismos grupos experimentales. Datos mostrados en media.

La comparación de la actividad espontánea basal de los animales control (no enriquecido) de 3 y 11 semanas indica que no hay una diferencia significativa entre la potencia total ni la potencia relativa entre ambos grupos (Figura 13). Esto indica que la edad no modifica la actividad espontánea basal de las neuronas Gr del BO.

## 7.4. Evaluación de la capacidad olfatoria

### 7.4.1. Evaluación olfatoria en animales enriquecidos: habituación- deshabituación

Previo a la obtención de rebanadas para los registros descritos se evaluó el aprendizaje olfatorio; la memoria (habituaación) y la discriminación olfatoria (deshabituación) (Yang y Crawley, 2009; Wesson et al, 2010) a través de una prueba de habituación-deshabituación. Se observó que el tiempo de exploración de la fuente de aroma se reduce cuando éste se muestra repetidamente (habituaación) y se incrementa cuando el aroma es novedoso (deshabituación) (ANOVA 2 vías:  $F_{(7,1875)}=37.06$ ;  $p<0.0001$ ). No hay diferencias en la ejecución de la tarea entre el grupo de animales control (no enriquecido) y el grupo de animales enriquecidos (ANOVA 2 vías:  $F_{(1,47.60)}=0.71$ ;  $p>0.05$ ).

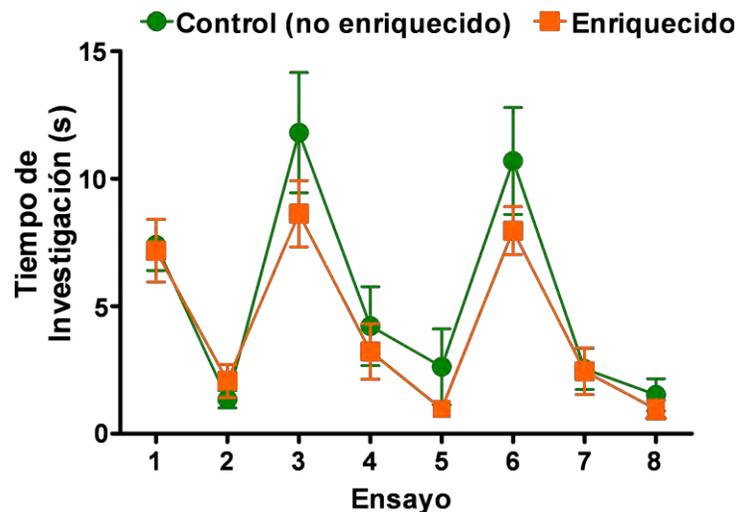


Figura 14 El enriquecimiento no modifica la detección de olores neutros

Desempeño en la tarea de habituación-deshabituación olfatoria de animales control-no enriquecidos (verde,  $n=10$ ) y enriquecidos olfatoriamente (anaranjado;  $n=10$ ).

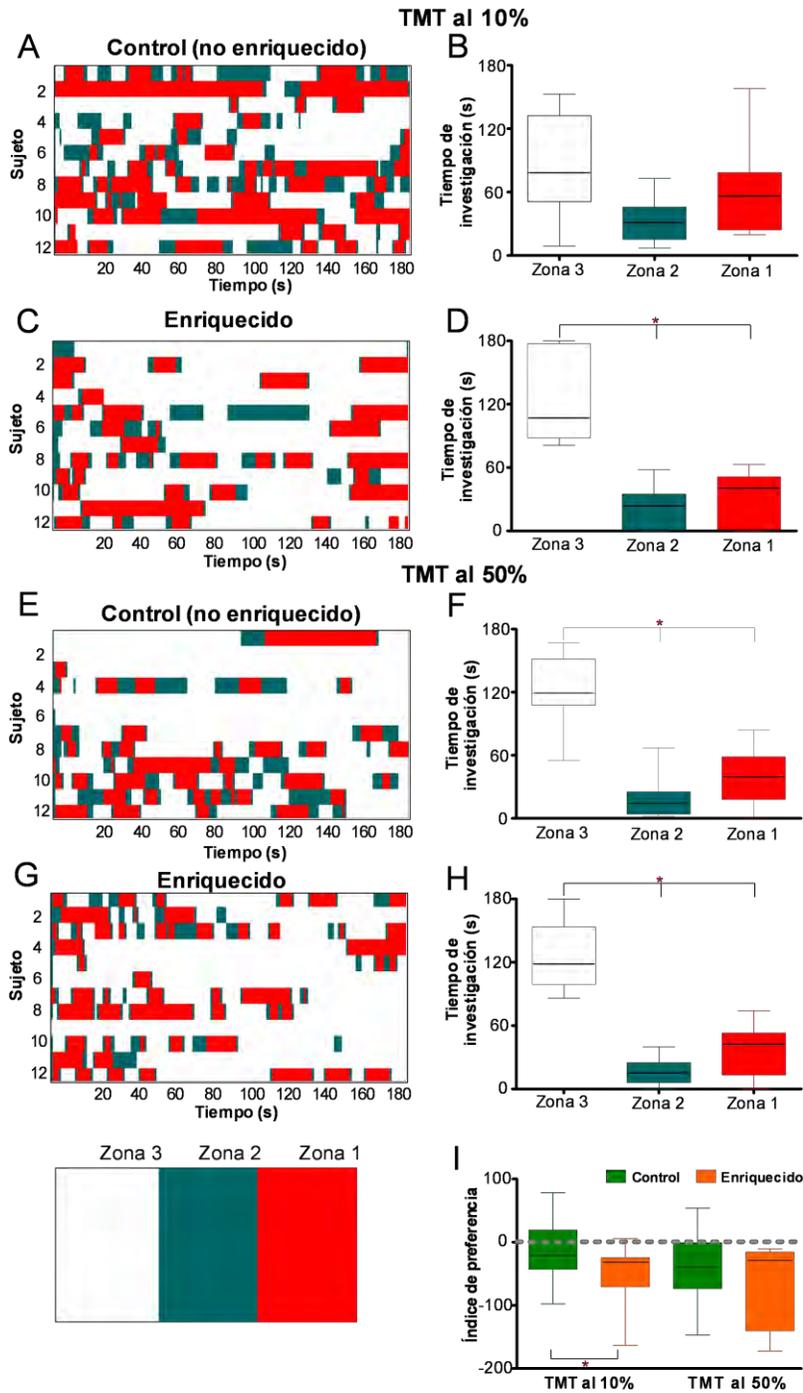
### 7.4.2. Evaluación olfatoria en animales enriquecidos: evitación olfatoria

Adicionalmente a la prueba olfatoria antes descrita, se evaluó el efecto del EO en una tarea de evitación olfatoria que desencadena una respuesta innata de escape (Cho et al., 2011; Lazarini et al., 2014). Para ello, se utilizó una caja rectangular, que se dividió en tercios y en uno de ellos se colocó un cuadro de papel filtro con 5  $\mu$ l de TMT al 10% o al 50%, éste fue llamado la zona 1. La prueba consiste en colocar al ratón en el centro de la caja y cuantificar el tiempo que invierte en cada uno de los tercios, durante 180 s (Cho et al., 2011; Lazarini et al., 2014).

El tiempo de permanencia en la zona 1 (rojo) cuando la concentración del TMT fue del 10% para los animales control en la zona 1 (rojo) es de  $61.33 \pm 12.28$  s, mientras que en el tercio opuesto (zona 3, blanco) el tiempo invertido fue de  $85.67 \pm 13.39$  s y de  $33 \pm 5.71$  s en el tercio central (zona 2, azul) (Figura 15 B). En cambio, los animales enriquecidos pasaron  $31.83 \pm 7.023$  s en la zona 1,  $125.30 \pm 11.90$  s en el compartimento opuesto y  $22.83 \pm 20.53$  s en el centro (Figura 15 D). Esta diferencia en el tiempo transcurrido en los diferentes compartimentos es estadísticamente significativa (Friedman=19.48;  $p < 0.001$ ). Notablemente, los animales enriquecidos ( $n=12$ ) pasan menos tiempo en la zona 1 (que corresponde al sitio con TMT al 10%) con respecto a los animales del grupo control (no enriquecido) (Figura 15 D) en los animales del grupo control ( $n=12$ ).

Al incrementar la concentración de TMT al 50 % los animales control (no enriquecidos) invirtieron  $39.33 \pm 7.09$  s en la zona 1,  $18.67 \pm 5.38$  s en la zona 2 y  $122 \pm 10.64$  s en la zona 3 (Figura 15 F) (Friedman=50.08,  $p < 0.001$  zona 3 contra zona 2,  $p < 0.01$  zona 3 contra zona 1). Mientras que, los animales enriquecidos, pasaron  $125.50 \pm 8.87$  s en la zona 3,  $16.67 \pm 3.43$  s en la zona 2 y  $37.83 \pm 6.76$  en la zona 1 (Figura 15 H) (Friedman=79.65,  $p < 0.001$  zona 3 contra zona 2,  $p < 0.01$  zona 3 contra zona 1). Es evidente que el incremento de la concentración de TMT es suficiente para que los animales control (no enriquecido) se aparten del sitio con el aroma aversivo de manera idéntica a como lo hacen los animales enriquecidos.

Finalmente, se cuantificó el índice preferencia (índice de preferencia=tiempo invertido en la zona 1 durante el ensayo con TMT menos el tiempo invertido en la zona 1 durante el ensayo pre-prueba) (Lazarini et al., 2014), con la finalidad de comparar cuantitativamente la aversión al TMT (ver métodos: prueba de evitación olfatoria). Los animales control (verde) obtuvieron un índice de preferencia de  $-11.92 \pm 14.17$  (Figura 15 I) y los animales enriquecidos (anaranjado) un índice de preferencia de  $-50.55 \pm 14.64$  (Figura 15 I) al ser expuestos a TMT al 10%. Estos índices son significativamente diferentes (U de Mann=34;  $p=0.02$ ). Al incrementar la concentración de TMT al 50% el índice de preferencia en el grupo control es de  $-41.42 \pm 15.36$  y el del grupo enriquecido es de  $-66.55 \pm 19.48$  (Figura 15 I) (U de Mann Whitney=55;  $p=0.25$ ). Estos índices no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )



**Figura 15** Los animales enriquecidos desempeñan mejor una tarea de evitación olfatoria

A-C Representación gráfica (raster plot) del sitio de permanencia de cada animal en la caja de prueba (dividida en tercios: zona 3 vehículo, zona 2 compartimento central y zona 3 TMT) en función del tiempo. Grupo no enriquecido (n=12, y enriquecido (n=12) con TMT concentrado al 10%. B-D Cuantificación del tiempo de permanencia en cada tercio de la caja durante la fase prueba del grupo no enriquecido y enriquecido. E-G raster plot del tiempo en el mismo experimento, pero con TMT concentrado al 50%. F-H Cuantificación del tiempo de permanencia en cada tercio de la caja durante la fase prueba del grupo no enriquecido y enriquecido. I Cuantificación del índice de preferencia se obtiene a partir de la sustracción del tiempo de permanencia en el tercio con TMT durante la fase pre- prueba y el tiempo de permanencia en el tercio con TMT en la fase de prueba. Control-no enriquecido; n=12, enriquecido; n=11 \* señala una diferencia estadísticamente significativa. Los resultados se muestran en mediana, cuartil 1 y 3, y rango (mínimo y máximo). Note que los animales control no enriquecidos requieren mayor concentración de TMT [50%] para evitar ese compartimento.

## 8. Discusión

En esta tesis se ha mostrado que el EO, que consiste en la exposición pasiva a 21 olores durante 21 días, uno cada día 2 por horas diarias, **(i)** no modifica la actividad espontánea de las neuronas Gr en animales jóvenes (Figura 7) ni adultos (Figura 10) **(ii)** evita el efecto inhibitorio del péptido  $\beta A_{1-42}$  en la actividad espontánea de las Gr del BO de animales jóvenes (Figura 8) y adultos (Figura 12) comparado sus correspondientes controles (Figura 6 y Figura 11 respectivamente) **(iii)** no modifica el desempeño de una prueba de habituación deshabituación (Figura 14) y **(iv)** mejora el desempeño de una prueba de evitación olfatoria (Figura 15).

### **(i) El EO no modifica la actividad espontánea de las neuronas Gr en animales jóvenes ni adultos**

La actividad espontánea de las neuronas Gr del BO no es modificada por el EO, este hallazgo es similar al encontrado por Buonviso y colaboradores (1998 y 2000) en las neuronas mitrales. En sus condiciones experimentales, el EO no produjo diferencias en la actividad espontánea de las neuronas Gr del BO, pero si se observó un efecto en el disparo neuronal es evidente a la exposición a un aroma. El EO reduce el porcentaje de neuronas mitrales que incrementa su frecuencia de disparo e incrementa el porcentaje de neuronas mitrales que no modifica su frecuencia de disparo durante la exposición al aroma familiar (usado para el EO) o a un aroma novedoso (Buonviso et al. 1998, 2000). Lo anterior, independientemente de la extensión de la activación bulbar del aroma usado (amplia, media, baja) durante el EO (6 días de exposición durante 20 min). La disminución del disparo de las mitrales podría deberse a algún cambio en el disparo de las Gr, cuya interacción dendrodendrítica se ve favorecida por el EO (Kato, Gillet, Peters, Isaacson, & Komiyama, 2013), lo que influye en la reducción de la hiperpolarización post-potencial de las neuronas M/E (Duménieu, Fourcaud-Trocmé, Garcia, & Kuczewski, 2015).

La respuesta de las neuronas Gr está regulada por las CAc, otro grupo de interneuronas que utilizan GABA como neurotransmisor (Tong et al., 2014). El EO incrementa la densidad de espinas dendríticas entre las Gr y las CAc (Arenkiel et al., 2011) y reduce la degradación de GABA por inhibición de la GABA transaminasa (Koo et al., 2003), lo que mantiene al neurotransmisor más tiempo disponible en el espacio sináptico (Koo et al., 2003). Además, las Gr reciben conexiones sinápticas de las fibras centrífugas (Arenkiel et al., 2011). Eso les da no sólo

un papel regulador de la salida de información del BO sino también integrador de la información eferente de la corteza (Tong et al., 2014).

El EO modifica la liberación del neurotransmisor de las NOS (Cadiou et al., 2014; Kass, Guang, Moberly, & McGann, 2015), lo que cambia la dinámica de la comunicación entre la periferia y el BO (Aroniadou-Anderjaska, Ennis, & Shipley, 1997). El cambio en la respuesta de las Gr puede deberse a la modificación de la respuesta glomerular, ya que distintos aromas activan regiones glomerulares que se sobreponen (Mandairon, Stack, Kiselycznyk, & Linster, 2006a), al menos parcialmente (Ressler, Sullivan, & Buck, 1994; Sullivan et al., 1995), lo que crea diferentes patrones de activación en las Gr. Sin embargo, también se ha demostrado que la exposición prolongada a un solo olor no sólo es insuficiente para inducir mejoría en el desempeño olfatorio o en la comunicación neuronal (Kass et al., 2015; Mandairon et al., 2008; Veyrac et al., 2009), sino que puede tener efectos degenerativos (Dóving & Pinching, 1972). Es por eso que el EO utilizado en esta tesis aprovecha que el BO puede ser activado por una amplia gama de olores (Davison & Katz, 2007; Mandairon, Stack, Kiselycznyk, et al., 2006a).

Asimismo, el EO induce la expresión del FNDC (factor neurotrófico derivado del cerebro) en BO (Degano, Park, Penati, Li, & Ronnett, 2014), lo que favorece la complejidad dendrítica de las Gr e induce que éstas produzcan genes de expresión temprana como c-fos (Guthrie & Gall, 1995) y zif268 (Mandairon et al., 2008) en respuesta a la exposición a un olor. Cabe resaltar que zif268 genera patrones de activación diferenciales en las Gr en respuesta a la exposición a un olor, según el aroma utilizado durante el EO (Mandairon et al., 2008). Este cambio correlaciona con mayor selectividad de las Gr ante los aromas (Mandairon, Stack, Kiselycznyk, et al., 2006a) y mejor discriminación olfatoria (Mandairon et al., 2008).

Estos resultados muestran que el BO es susceptible al EO en las edades utilizadas, lo que podría conducir a cambios moleculares y a modificaciones en la actividad eléctrica en respuesta a un aroma que podrían ser el sustrato del efecto preventivo ante los efectos deletéreos del péptido  $\beta$ A.

**(ii) El EO evita el efecto inhibitorio del péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub> en la actividad espontánea de las neuronas Gr del BO de animales jóvenes y adultos comparado con animales control jóvenes y adultos**

Los resultados obtenidos indican que el EO mantiene inalterada la potencia de la actividad espontánea de las neuronas Gr del BO en presencia del péptido  $\beta$ A en rebanadas tanto de animales jóvenes (Figura 8) como de animales adultos (Figura 12), lo que sugiere que el EO activa un mecanismo “protector” que se desencadena por la exposición frecuente y variada a olores (21 días) sin modificar los componentes de potencia ni frecuencia. Datos de nuestro laboratorio confirman que un EO con estas características es eficaz para prevenir el efecto inhibitorio del péptido  $\beta$ A *in vivo* en animales adultos (8-10 semanas) tanto en la actividad espontánea como en la respuesta a olores (Hernández-Soto, 2015). Es importante mencionar que la concentración de  $\beta$ A utilizada se considera patológicamente relevante (30nM) (Lue et al., 1999).

El efecto inhibitorio del  $\beta$ A<sub>1-42</sub> sobre la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica parece ser mayor en las interneuronas de distintos circuitos neuronales relacionados con el sistema olfatorio, tales como el BO (Alvarado-Martínez et al., 2013; Cornejo-Montes de Oca, 2016; Masurkar & Devanand, 2014), la CE (Peña-Ortega et al., 2012) y el hipocampo (Palop et al., 2007; Verret et al., 2012). Sin embargo, no se descarta que el  $\beta$ A puede interferir con la función de las neuronas colinérgicas y glutamatérgicas (Isla, Vázquez-Cuevas, & Peña-Ortega, 2016; Palop & Mucke, 2010).

En el BO, las Gr responden a la activación glutamatérgica recibida de las neuronas M/E (Arevian, Kapoor, & Urban, 2008; Burton & Urban, 2015). Los receptores NMDA, uno de los blancos del péptido  $\beta$ A (LaFerla, Green, & Oddo, 2007), se encargan de despolarizar las espinas dendríticas de las neuronas Gr (McTavish et al., 2012) y de proveer de la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria para la liberación dendrítica de GABA (Ennis et al., 2007). Los receptores NMDA se expresan mayoritariamente en las dendritas apicales de las neuronas Gr del BO (Ennis et al., 2007; Shepherd et al., 2007) y su activación la produce inhibición de las neuronas M/E (Nagayama et al., 2014; Shepherd, G.M., 1972).

La reducción de la actividad espontánea de las neuronas Gr tras la aplicación del péptido  $\beta$ A podría deberse a la inhibición de estos receptores NMDA (Cirrito et al., 2005), lo que impediría la comunicación adecuada de las neuronas Gr y las células M/E del BO (Arevian et al., 2008; Bathellier, Lagier, Faure, & Pierre-Marie Lledo, 2005; Friedman & Strowbridge, 2003). Además, a nivel presináptico, el péptido  $\beta$ A podría afectar también a los auto-receptores tipo

NMDA de las neuronas M/E, lo que favorecería la disminución de la actividad espontánea del BO (Friedman & Strowbridge, 2003).

Es indispensable mencionar que las neuronas Gr no son las únicas que expresan receptores NMDA en el circuito del BO (Ennis et al., 2007). Este receptor también se encuentra presente en las sinapsis que establecen las NOS en los glomérulos (Ennis et al., 2007; Tong et al., 2014), por lo que éste es importante desde el proceso de convergencia de información olfatoria (Yaksi & Wilson, 2010). Lo anterior es importante si se considera que la interferencia que ejerce el péptido  $\beta$ A sobre estos receptores, en los diferentes grupos neuronales y sinápticos podría influir en la reducción de la actividad espontánea Gr, como un efecto global en el circuito (Ennis et al., 2007).

Afectar el funcionamiento de las Gr evita que éstas modulen la sincronía de las neuronas principales (Buzsáki, 2011), que generen contrastes y que seleccionen la información tanto de entrada como de salida (Kandel, 2012). En el BO las Gr generarán el ritmo  $\gamma$  (Friedman & Strowbridge, 2003; Kay, 2014) y responden de forma selectiva a los olores (Labarrera, London, & Angelo, 2013). Además, el incremento del GABA favorece la discriminación olfativa (Abraham et al., 2010), mientras que la perturbación de la comunicación entre las Gr provoca el detrimento de la resolución olfatoria (Bathellier et al., 2005; Rojas-Líbano & Kay, 2008). El posible que el EO provoque un cambio en el balance inhibición/excitación lo que podría ser parte del mecanismo “protector” del BO contra el efecto del  $\beta$ A.

Es posible también que el estado “protector” (Proud, 2007) desencadenado por el EO se deba a diversos mecanismos moleculares y anatómicos (Alonso et al., 2008; Gheusi et al., 2000; Gire & Schoppa, 2008; Mandairon, Stack, Kiselycznyk, et al., 2006b; Rochefort et al., 2002; Watt et al., 2004). Por ejemplo, la neurogénesis, que se fomenta durante el EO y proporciona un incremento de factores tróficos (Alonso et al., 2008; Bath & Lee, 2010), incluido el FNDC (Xu, Wang, Chen, Rao, & Xu, 2013). Los factores tróficos pueden influir en el destino de las células progenitoras neurales (Bath & Lee, 2010), regular la plasticidad cortical al promover la maduración de la inhibición (Huang et al., 1999) e incrementar la complejidad y el número de las espinas dendríticas distales de las Gr del BO (Degano et al., 2014; McDole, Isgor, Pare, & Guthrie, 2015). Esto último debido al favorecimiento de la excitación glutamatérgica (Matsutani & Yamamoto, 2004). Por ello, aquí proponemos que la continua activación de los diferentes

grupos de NOS durante el EO producirá la liberación de factores tróficos y neurotransmisores, mismos que favorecerían la función del circuito del BO (Nagayama et al., 2014).

Uno de los mecanismos intracelulares que induce el  $\beta$ A soluble es activar a la quinasa de la glucógeno sintasa 3  $\beta$  (QGS3 $\beta$ ) (DaRocha-Souto et al., 2012). La QGS3 $\beta$  está ampliamente distribuida en el SNC, incluso en el BO y de particular interés para esta tesis en las Gr (Xu et al., 2013). La actividad de la QGS3 $\beta$  depende de su estado de fosforilación (Hooper, Killick, & Lovestone, 2008), el cual es influido por la actividad neuronal (Xu et al., 2013). De forma relevante para esta tesis, la actividad de la QGS3 $\beta$  en el BO es modulada por la estimulación olfatoria (Xu et al., 2013). Especialmente, se ha demostrado que la QGS3 $\beta$  participa en el proceso de apoptosis neuronal y en el fomento de la vía amiloidogénica (incremento de la producción de  $\beta$ A) asociados a la EA (Hooper et al., 2008; Kamenetz et al., 2003; Zhang et al., 2011), por lo que la modulación de su actividad en respuesta al EO (Xu et al., 2013), podría influir en la sensibilidad del BO al  $\beta$ A.

Como se mencionó previamente, el EO que induce mayor producción de factores tróficos en el BO (Degano et al., 2014; McDole et al., 2015) que activan a sus receptores (Proud, 2007) y modulan el estado de fosforilación de la QGS3 $\beta$  (Proud, 2007). Es decir, que el estado de fosforilación de la QGS3 $\beta$  está regulado por la activación de receptores para factores tróficos y por la experiencia olfatoria (Xu et al., 2013). De forma interesante, otra proteína que participa en el efecto deletéreo del  $\beta$ A es la proteína Tau (Avila et al., 2012; G. Johnson & Stoothoff, 2004) cuyo estado de fosforilación también es regulado por la QGS3 $\beta$ .

La proteína Tau regula el transporte vesicular (G. Johnson & Stoothoff, 2004) y la estabilidad del citoesqueleto (G. Johnson & Stoothoff, 2004) de forma fisiológica, mientras que en estado patológico se encuentra hiperfosforilada (Avila et al., 2012), como en los cerebros de pacientes con EA (Braak & Braak, 1991). Se ha postulado que el efecto del  $\beta$ A depende de la presencia de la proteína Tau (Shipton et al., 2011). Esto es relevante, ya que el EO cambia la fosforilación de la proteína Tau en el hipocampo y en la corteza cerebral (Liao et al., 2012), es posible que también lo haga en el BO, probablemente a través de un proceso mediado por la QGS3 $\beta$  (Xu et al., 2013). Cabe resaltar que inhibir la activación de la QGS3 $\beta$  impide el efecto inhibitorio del  $\beta$ A en el BO (Cornejo-Montes de Oca, 2016).

### **(iii) El EO no modifica el desempeño de una prueba de habituación-deshabitación**

Los resultados encontrados en nuestros experimentos muestran que la ejecución de la prueba de habituación-deshabitación no es distinta entre los animales del grupo no enriquecido y del grupo enriquecido (figura 14). Se ha demostrado que el EO facilita el desempeño olfatorio de la discriminación olfatoria entre aromas muy similares (Mandairon, Stack, Kiselycznyk, et al., 2006b) o entre mezclas de ellos (Mandairon, Stack, & Linster, 2006). Sin embargo, los olores elegidos (vainilla y vinagre), son por sí mismos lo suficientemente distintos entre ellos para que los animales del grupo no enriquecido los discriminen de manera eficiente. Es decir, que los estímulos olfatorios utilizados no representan un reto para el BO enriquecido.

### **(iv) El EO mejora el desempeño de una prueba de evitación olfatoria**

En la prueba de evitación olfatoria, los animales EO se apartan más eficientemente (en comparación con los animales no enriquecidos) del sitio con el aroma aversivo (TMT) cuando éste se encuentra menos concentrado (al 10%) (Figura 15). Como ya se mencionó, los patrones de activación inducidos por la amplia gama de olores utilizada en estos experimentos produce distintas combinaciones de activación glomerular y es posible que éstos influyan en la respuesta de las Gr a los olores (Ressler et al., 1994; Sullivan et al., 1995), lo que facilita la sinápsis dendrodendrítica entre las neuronas M/E y las interneuronas Gr (Kato et al., 2013) y favorezca la actividad del GABA, misma que mejora la discriminación olfatoria (Abraham et al., 2010) lo que posiblemente incremente la resolución del BO en respuesta a olores relevantes como el TMT.

En particular, se ha descrito que los mapas glomerulares del BO del ratón tienen dos dominios funcionales distintos, el D<sub>I</sub> y el D<sub>II</sub>. Los glomérulos específicos en el dominio D<sub>II</sub> responde al aroma aversivo (TMT) e involucran a la respuesta innata al miedo, lo que sugeriría que el EO utilizado en estos experimentos favorecería de cierta forma a los glomérulos que conforman al dominio D<sub>II</sub> (Cho et al., 2011). En este sentido, se ha encontrado que el efecto del EO depende en cierta medida de olores expuestos (Cadiou et al., 2014), por lo que es posible que el EO induzca cambios en ciertas poblaciones neuronales y no en otras dependiendo de los aromas a los que fueron expuestas.

Por otro lado, el BO se comunica directamente con el sistema límbico, particularmente con la amígdala (Root et al., 2014), misma que está implicada en las respuestas emocionales

(LeDoux, 2000), por lo que es posible que esta estimulación olfatoria multivariada esté facilitando la eferencia del BO a la amígdala.

## 9. Consideraciones finales

Con base en la información revisada y a los resultados de esta tesis, proponemos que la estimulación olfatoria pasiva puede ser una medida terapéutica fácilmente aplicable en humanos, pues ha demostrado tener efectos benéficos sobre la actividad eléctrica (Lorig, Herman, Schwartz, & Cain, 1990), sobre la cognición (memoria, atención, toma de decisiones) (Gould & Martin, 2001; Parker, Ngu, & Cassaday, 2001), el estado de alerta (*arousal*) (Başer & Buchbauer, 2010), el estado emocional (ansiolítico) (Herz, Eliassen, Belan, & Souza, 2004; Lehrner, Eckersberger, Walla, Pötsch, & Deecke, 2000) y la percepción (dolor) (Başer & Buchbauer, 2010), incluso sin necesidad que se advierta la presencia ambiental de los mismos (Başer & Buchbauer, 2010; A. J. Johnson, 2011).

El mecanismo de acción y el efecto “protector” de la actividad espontánea de las Gr del BO sugeridos en esta tesis podrían sustentar ampliamente el efecto de la exposición a olores encontrado en humanos, que puede ser benéfico (A. J. Johnson, 2011) o dañino (Calderón-Garcidueñas et al., 2010; Colín-Barenque, Dorado-Martinez, Rivas-Arancibia, Avila-Costa, & Fortoul, 2005) según la naturaleza del aroma y su connotación placentera o desagradable.

Sería interesante que, a partir de estos hallazgos, se corroborara si se requiere de la estimulación olfatoria variada o si un aroma puede reproducir los resultados obtenidos en esta tesis. En este sentido, una estrategia a seguir sería utilizar un aroma contenido en los 21 del EO utilizados en este protocolo de EO y probar sus efectos en la actividad espontánea del BO, en su sensibilidad al  $\beta$ A y en la conducta olfatoria. Además, sería interesante conocer sus efectos cognitivos, afectivos o perceptuales no solo en roedores sino en humanos. Cabe mencionar que la preferencia olfatoria es muy similar entre ratones y humanos (Mandairon, Poncelet, Bensafi, & Didier, 2009), lo que podría sustentar mejor alguna aproximación terapéutica de estos resultados. Otro aspecto que no se puede dejar de evaluar es la respuesta granular ante la estimulación de la “sensorial” *in vitro* para conocer si el EO es útil para mantener la función olfatoria como se ha demostrado *in vivo* (Hernández-Soto, 2015). Finalmente, la estimulación sensorial ha sido utilizada en humanos para el tratamiento de personas con dificultades en el aprendizaje (Kwok, To, & Sung, 2003), por lo que ahora lo sugerimos al EO como una buena estrategia para prevenir o retrasar el envejecimiento patológico (Frick & Benoit, 2010) como la EA.

## **10. Conclusiones**

El enriquecimiento olfatorio no modifica la potencia ni la frecuencia de la actividad espontánea de las neuronas granulares del bulbo olfatorio.

El enriquecimiento olfatorio previene la disminución de la actividad espontánea producida por el péptido  $\beta$  amiloide *in vitro*.

El enriquecimiento olfatorio mejora la ejecución de una tarea de evitación olfatoria.

## Referencias

- Abraham, N. M., Egger, V., Shimshek, D. R., Renden, R., Fukunaga, I., Sprengel, R., ... Kuner, T. (2010). Synaptic inhibition in the olfactory bulb accelerates odor discrimination in mice. *Neuron*, *65*(3), 399–411. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.009>
- Adaya-Villanueva, A., Ordaz, B., Balleza-Tapia, H., Márquez-Ramos, A., & Peña-Ortega, F. (2010). Beta-like hippocampal network activity is differentially affected by amyloid beta peptides. *Peptides*, *31*(9), 1761–1766. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.003>
- Adrian, E. D. (1950). The electrical activity of the mammalian olfactory bulb. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *2*(1), 377–388. [http://doi.org/10.1016/0013-4694\(50\)90075-7](http://doi.org/10.1016/0013-4694(50)90075-7)
- Alegret, M., Cuberas-Borrós, G., Espinosa, A., Valero, S., Hernández, I., Ruíz, A., ... others. (2014). Cognitive, genetic, and brain perfusion factors associated with four year incidence of Alzheimer's disease from mild cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's Disease*, *41*(3), 739–748. <http://doi.org/10.3233/JAD-132516>
- Alonso, M., Ortega-Pérez, I., Grubb, M. S., Bourgeois, J.-P., Charneau, P., & Lledo, P.-M. (2008). Turning astrocytes from the rostral migratory stream into neurons a role for the olfactory sensory organ. *The Journal of Neuroscience*, *28*(43), 11089–11102. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3713-08.2008>
- Alvarado-Martínez, R. (2012). *Efecto de la proteína beta amiloide sobre la actividad espontánea de la capa granular del bulbo olfatorio*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neurobiología, Querétaro.
- Alvarado-Martínez, R., Salgado-Puga, K., & Peña-Ortega, F. (2013). Amyloid beta inhibits olfactory bulb activity and the ability to smell. *PLoS ONE*, *8*(9), e75745. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0075745>
- Arendt, T. (2009). Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, *118*(1), 167–179. <http://doi.org/10.1007/s00401-009-0536-x>
- Arenkiel, B. R., Hasegawa, H., Yi, J. J., Larsen, R. S., Wallace, M. L., Philpot, B. D., ... Ehlers, M. D. (2011). Activity-induced remodeling of olfactory bulb microcircuits revealed by monosynaptic tracing. *PLoS ONE*, *6*(12), e29423. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0029423>
- Arevian, A. C., Kapoor, V., & Urban, N. N. (2008). Activity-dependent gating of lateral inhibition in the mouse olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, *11*(1), 80–87. <http://doi.org/10.1038/nn2030>
- Aroniadou-Anderjaska, V., Ennis, M., & Shipley, M. T. (1997). Glomerular synaptic responses to olfactory nerve input in rat olfactory bulb slices. *Neuroscience*, *79*(2), 425–434. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3034-09.2009>
- Astic, L., & Cattarelli, M. (1982). Metabolic mapping of functional activity in the rat olfactory system after a bilateral transection of the lateral olfactory tract. *Brain research*, *245*(1), 17–25. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90335-3](http://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90335-3)

- Attems, J., Walker, L., & Jellinger, K. A. (2014). Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathologica*, 127(4), 459–475. <http://doi.org/10.1007/s00401-014-1261-7>
- Avila, J., León-Espinosa, G., García, E., García-Escudero, V., Hernández, F., & DeFelipe, J. (2012). Tau phosphorylation by GSK3 in different conditions. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 1–7. <http://doi.org/10.1155/2012/578373>
- Babizhayev, M. A., Deyev, A. I., & Yegorov, Y. E. (2011). Olfactory dysfunction and cognitive impairment in age-related neurodegeneration: prevalence related to patient selection, diagnostic criteria and therapeutic treatment of aged clients receiving clinical neurology and community-based care. *Current clinical pharmacology*, 6(4), 236–259. <http://doi.org/10.2174/157488411798375903>
- Bäckman, L., Jones, S., Berger, A.-K., Laukka, E. J., & Small, B. (2004). Multiple cognitive deficits during the transition to Alzheimer's disease. *Journal of internal medicine*, 256(3), 195–204. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01386.x>
- Bahar-Fuchs, A., Moss, S., Rowe, C., & Savage, G. (2010). Olfactory performance in AD, aMCI, and healthy ageing: a unirhinal approach. *Chemical Senses*, 35(9), 855–862. <http://doi.org/10.1093/chemse/bjq094>
- Balleza-Tapia, H. (2014). *Caracterización de la vía transduccional involucrada en los efectos de la proteína beta amiloide sobre la dinámica de las redes neuronales del hipocampo* (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neurobiología, Querétaro.
- Balleza-Tapia, H., Huanosta-Gutiérrez, A., Márquez-Ramos, A., Arias, N., & Peña-Ortega, F. (2010). Amyloid  $\beta$  oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner. *Current Alzheimer Research*, 453–462.
- Başer, K. H. C., & Buchbauer, G. (Eds.). (2010). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis.
- Bath, K. G., & Lee, F. S. (2010). Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis. *Developmental Neurobiology*, NA-NA. <http://doi.org/10.1002/dneu.20781>
- Bathellier, B., Lagier, S., Faure, P., & Pierre-Marie Lledo. (2005). Circuit properties generating gamma oscillations in a network model of the olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology*, 95(4), 2678–2691. <http://doi.org/10.1152/jn.01141.2005>
- Beer, R. E., & Ulrich, J. (1993). Alzheimer plaque density and duration of dementia. *Archives of Gerontology and Geriatrics Journal*, 16, 1–7. [http://doi.org/10.1016/0167-4943\(93\)90021-9](http://doi.org/10.1016/0167-4943(93)90021-9)
- Bilkei-Gorzo, A. (2014). Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 142(2), 244–257. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.12.009>
- Bovetti, S., Veyrac, A., Peretto, P., Fasolo, A., & De Marchis, S. (2009). Olfactory enrichment influences adult neurogenesis modulating GAD67 and plasticity-related molecules expression in newborn cells of the olfactory bulb. *PLoS ONE*, 4(7), e6359. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0006359>

- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82(4), 239–259. <http://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Breton-Provencher, V., & Saghatelian, A. (2012). Newborn neurons in the adult olfactory bulb: Unique properties for specific odor behavior. *Behavioural Brain Research*, 227(2), 480–489. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.08.001>
- Buck, L. B. (1992). The olfactory multigene family. *Current opinion in genetics & development*, 2(3), 467–473. [http://doi.org/10.1016/S0959-437X\(05\)80159-5](http://doi.org/10.1016/S0959-437X(05)80159-5)
- Buck, L. B. (1996). Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annual review of neuroscience*, 19(1), 517–544. <http://doi.org/10.1146/annurev.ne.19.030196.002505>
- Buonviso, N., & Chaput, M. (2000). Olfactory experience decreases responsiveness of the olfactory bulb in the adult rat. *Neuroscience*, 95(2), 325–332. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00450-9](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00450-9)
- Buonviso, N., Gervais, R., Chalansonnet, M., & Chaput, M. (1998). Short-lasting exposure to one odour decreases general reactivity in the olfactory bulb of adult rats. *European Journal of Neuroscience*, 10, 2472–2475. <http://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00266.x>
- Buron, G., Hacquemand, R., Pourie, G., Lucarz, A., Jacquot, L., & Brand, G. (2007). Comparative behavioral effects between synthetic 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) and the odor of natural fox (*Vulpes vulpes*) feces in mice. *Behavioral Neuroscience*, 121(5), 1063–1072. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.121.5.1063>
- Burton, S. D., & Urban, N. N. (2015). Rapid feedforward inhibition and asynchronous excitation regulate granule cell activity in the mammalian main olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 35(42), 14103–14122. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0746-15.2015>
- Buzsáki, G. (2011). *Rhythms of the brain*. New York: Oxford University Press.
- Buzsáki, G., Anastassiou, C. A., & Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(6), 407–420. <http://doi.org/10.1038/nrn3241>
- Cadiou, H., Aoude, I., Tazir, B., Molinas, A., Fenech, C., Meunier, N., & Grosmaître, X. (2014). Postnatal odorant exposure induces peripheral olfactory plasticity at the cellular level. *Journal of Neuroscience*, 34(14), 4857–4870. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0688-13.2014>
- Calderón-Garcidueñas, L., Franco-Lira, M., Henríquez-Roldán, C., Osnaya, N., González-Maciél, A., Reynoso-Robles, R., ... Doty, R. L. (2010). Urban air pollution: Influences on olfactory function and pathology in exposed children and young adults. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(1), 91–102. <http://doi.org/10.1016/j.etp.2009.02.117>
- Cao, L., Rickenbacher, G. T., Rodriguez, S., Moulija, T. W., & Albers, M. W. (2012). The precision of axon targeting of mouse olfactory sensory neurons requires the BACE1 protease. *Scientific Reports*, 2. <http://doi.org/10.1038/srep00231>
- Cao, L., Schrank, B. R., Benz, E. G., Moulija, T. W., Rickenbacher, G. T., Gomez, A. C., ... Albers, M. W. (2012). A $\beta$  alters the connectivity of olfactory neurons in the absence of amyloid plaques in vivo. *Nature Communications*, 4(2154), 1–10. <http://doi.org/10.1038/ncomms2013>

- Cassano, T., Romano, A., Macheda, T., Colangeli, R., Cimmino, C. S., Petrella, A., ... Gaetani, S. (2011). Olfactory memory is impaired in a triple transgenic model of Alzheimer disease. *Behavioural Brain Research*, 224(2), 408–412. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.06.029>
- Catlow, B. J., Rowe, A. R., Clearwater, C. R., Mamcarz, M., Arendash, G. W., & Sanchez-Ramos, J. (2009). Effects of environmental enrichment and physical activity on neurogenesis in transgenic PS1/APP mice. *Brain Research*, 1256, 173–179. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.12.028>
- Cho, J. H., Prince, J. E. A., Cutforth, T., & Cloutier, J.-F. (2011). The pattern of glomerular map formation defines responsiveness to aversive odorants in mice. *Journal of Neuroscience*, 31(21), 7920–7926. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2460-10.2011>
- Chuang, T. T. (2010). Neurogenesis in mouse models of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1802(10), 872–880. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.008>
- Cirrito, J. R., Yamada, K. A., Finn, M. B., Sloviter, R. S., Bales, K. R., May, P. C., ... Holtzman, D. M. (2005). Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid- $\beta$  levels in vivo. *Neuron*, 48(6), 913–922. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.028>
- Colín-Barenque, L., Dorado-Martinez, C., Rivas-Arancibia, S., Avila-Costa, M. R., & Fortoul, T. I. (2005). Morphological recovery of the granule cells from the olfactory bulb after the cessation of acute ozone exposure. *International Journal of Neuroscience*, 115(3), 411–421. <http://doi.org/10.1080/00207450590521028>
- Connelly, T., Farmer, J. M., Lynch, D. R., & Doty, R. L. (2003). Olfactory dysfunction in degenerative ataxias. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 74(10), 1435–1437. <http://doi.org/10.1136/jnnp.74.10.1435>
- Constantinou, M., Elijah, D. H., Squirrell, D., Gigg, J., & Montemurro, M. A. (2015). Phase-locking of bursting neuronal firing to dominant LFP frequency components. *Biosystems*, 136, 73–79. <http://doi.org/10.1016/j.biosystems.2015.08.004>
- Coopersmith, R., Henderson, S. R., & Leon, M. (1986). Odor specificity of the enhanced neural response following early odor experience in rats. *Developmental Brain Research*, 27, 191–197. [http://doi.org/10.1016/0165-3806\(86\)90245-2](http://doi.org/10.1016/0165-3806(86)90245-2)
- Coopersmith, R., & Leon, M. (1986). Enhanced neural response by adult rats to odors experienced early in life. *Brain Research*, 371, 400–403. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90384-7](http://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90384-7)
- Cornejo-Montes de Oca, J. M. (2016). *Papel de la enzima GSK3 y la proteína Tau en las alteraciones de la actividad eléctrica del bulbo olfatorio producidas por la proteína  $\beta$ -Amiloide*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neurobiología, Querétaro.
- Cummings, D. M., Snyder, J. S., Brewer, M., Cameron, H. A., & Belluscio, L. (2014). Adult neurogenesis is necessary to refine and maintain circuit specificity. *Journal of Neuroscience*, 34(41), 13801–13810. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2463-14.2014>

- DaRocha-Souto, B., Coma, M., Pérez-Nievas, B. G., Scotton, T. C., Siao, M., Sánchez-Ferrer, P., ... Gómez-Isla, T. (2012). Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates  $\beta$ -amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *45*, 425–437. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.09.002>
- Daulatzai, M. A. (2015). Olfactory dysfunction: its early temporal relationship and neural correlates in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, *122*(10), 1475–1497. <http://doi.org/10.1007/s00702-015-1404-6>
- Davison, I. G., & Katz, L. C. (2007). Sparse and selective odor coding by mitral/tufted neurons in the main olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, *27*(8), 2091–2101. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3779-06.2007>
- Degano, A. L., Park, M. J., Penati, J., Li, Q., & Ronnett, G. V. (2014). MeCP2 is required for activity-dependent refinement of olfactory circuits. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *59*, 63–75. <http://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.01.005>
- Doty, R. L. (2012). Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiology of Disease*, *46*(3), 527–552. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.10.026>
- Dóvning, K. B., & Pinching, A. J. (1972). Selective degeneration of neurones in the olfactory bulb following prolonged odour experience. *Brain Research*, *52*, 115–129. <http://doi.org/10.1016@0006-89937390653-7>
- Duménieu, M., Fourcaud-Trocmé, N., Garcia, S., & Kuczewski, N. (2015). Afterhyperpolarization (AHP) regulates the frequency and timing of action potentials in the mitral cells of the olfactory bulb: role of olfactory experience. *Physiological Reports*, *3*(5), e12344–e12344. <http://doi.org/10.14814/phy2.12344>
- Duyckaerts, C., Potier, M.-C., & Delatour, B. (2007). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathologica*, *115*(1), 5–38. <http://doi.org/10.1007/s00401-007-0312-8>
- Ennis, M., Hamilton, K. A., & Hayar, A. (2007). Neurochemistry of the main olfactory system. In D. A. Jonhson & A. Lajtha (Eds.), *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Sensory Neurochemistry* (pp. 137–204). New York: Springer Science.
- Escanilla, O., Mandairon, N., & Linster, C. (2008). Odor-reward learning and enrichment have similar effects on odor perception. *Physiology & Behavior*, *94*(4), 621–626. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.03.008>
- Esiri, M. M., & Wilcock, G. K. (1984). The olfactory bulbs in Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *47*, 56–60. <http://doi.org/10.1111/nan.12309>
- Förstl, H., & Kurz, A. (1999). Clinical features of Alzheimer's disease. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, *249*(6), 288–290. <http://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.0606>
- Franks, K. H., Chuah, M. I., King, A. E., & Vickers, J. C. (2015). Connectivity of pathology: the olfactory system as a model for network-driven mechanisms of Alzheimer's disease pathogenesis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *7*. <http://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00234>

- Frick, K. M., & Benoit, J. D. (2010). Use It or Lose It: Environmental Enrichment as a Means to Promote Successful Cognitive Aging. *The Scientific World JOURNAL*, *10*, 1129–1141. <http://doi.org/10.1100/tsw.2010.111>
- Friedman, D., & Strowbridge, B. W. (2003). Both electrical and chemical synapses mediate fast network oscillations in the olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology*, *89*(5), 2601–2610. <http://doi.org/10.1152/jn.00887.2002>
- Fukunaga, I., Berning, M., Kollo, M., Schmaltz, A., & Schaefer, A. T. (2012). Two Distinct Channels of Olfactory Bulb Output. *Neuron*, *75*(2), 320–329. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.017>
- Garcia-Osta, A., & Alberini, C. M. (2009). Amyloid beta mediates memory formation. *Learning & Memory*, *16*(4), 267–272. <http://doi.org/10.1101/lm.1310209>
- Gheusi, G., Cremer, H., McLean, H., Chazal, G., Vincent, J.-D., & Lledo, P.-M. (2000). Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(4), 1823–1828. <http://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1823>
- Gire, D. H., & Schoppa, N. E. (2008). Long-term enhancement of synchronized oscillations by adrenergic receptor activation in the olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology*, *99*(4), 2021–2025. <http://doi.org/10.1152/jn.01324.2007>
- Gould, A., & Martin, N. (2001). A good odour to breathe? The effect of pleasant ambient odour on human visual vigilance. *Applied Cognitive Psychology*, *15*, 225–232.
- Gourevitch, B., Kay, L. M., & Martin, C. (2010). Directional coupling from the olfactory bulb to the hippocampus during a go/no-go odor discrimination task. *Journal of Neurophysiology*, *103*(5), 2633–2641. <http://doi.org/10.1152/jn.01075.2009>
- Gracey, D. J., & Morris, R. G. (2007). Neuropsychological assessment in dementia. *Psychiatry*, *6*(12), 498–502. <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.57.102904.190024>
- Gusmão, I. D., Monteiro, B. M. M., Cornélio, G. O. S., Fonseca, C. S., Moraes, M. F. D., & Pereira, G. S. (2012). Odor-enriched environment rescues long-term social memory, but does not improve olfaction in social isolated adult mice. *Behavioural Brain Research*, *228*(2), 440–446. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.040>
- Guthrie, K. M., & Gall, C. M. (1995). Functional mapping of odor-activated neurons in the olfactory bulb. *Chemical senses*, *20*(2), 271–282.
- Hampel, H. (2013). Amyloid- $\beta$  and cognition in aging and Alzheimer's disease: molecular neurophysiological mechanisms. *Journal of Alzheimer's Disease*, *33*, S79–S86. <http://doi.org/10.3233/JAD-2012-129003>
- Hawkes, C. H., & Doty, R. L. (2009). *The neurology of olfaction*. Leiden: Cambridge University Press. Recuperado a partir de <http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=412807>
- Helmes, E., & Østbye, T. (2002). Beyond memory impairment: cognitive changes in Alzheimer's disease. *Archives of clinical neuropsychology*, *17*(2), 179–193. [http://doi.org/10.1016/S0887-6177\(00\)00109-8](http://doi.org/10.1016/S0887-6177(00)00109-8)

- Hennessy, M. B., Smotherman, W. P., & Levine, S. (1977). Early olfactory enrichment enhances later consumption of novel substances. *Physiology & behavior*, *19*(4), 481–483. [http://doi.org/10.1016/0031-9384\(77\)90221-9](http://doi.org/10.1016/0031-9384(77)90221-9)
- Hernández-Soto, R. (2015, noviembre). *Cambios en la actividad eléctrica bulbar in vivo inducidos por el enriquecimiento olfatorio*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
- Herring, A., Ambrée, O., Tomm, M., Habermann, H., Sachser, N., Paulus, W., & Keyvani, K. (2009). Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. *Experimental Neurology*, *216*(1), 184–192. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.11.027>
- Herz, R. S., Eliassen, J., Belan, S., & Souza, T. (2004). Neuroimaging evidence for the emotional potency of odor-evoked memory. *Neuropsychologia*, *42*, 371–378. <http://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2003.08.009>
- Higuchi, M., Iwata, N., & Saido, T. C. (2005). Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1751*(1), 60–67. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.02.013>
- Hökfelt, T., Smith, C. B., Peters, A., Norell, G., Crane, A., Brownstein, M., & Sokoloff, L. (1983). Improved resolution of the 2-deoxy-D-glucose technique, *289*, 311–316. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90032-X](http://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90032-X)
- Hooper, C., Killick, R., & Lovestone, S. (2008). The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease: GSK3 and Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *104*(6), 1433–1439. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x>
- Huang, Z. J., Kirkwood, A., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Morales, B., Bear, M. F., ... Tonegawa, S. (1999). BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell*, *98*(6), 739–755.
- Igarashi, K. M., Ieki, N., An, M., Yamaguchi, Y., Nagayama, S., Kobayakawa, K., ... Mori, K. (2012). Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. *Journal of Neuroscience*, *32*(23), 7970–7985. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0154-12.2012>
- Isla, A. G., Vázquez-Cuevas, F. G., & Peña-Ortega, F. (2016). Exercise prevents amyloid- $\beta$ -induced hippocampal network disruption by inhibiting GSK3 $\beta$  activation. *Journal of Alzheimer's Disease*. <http://doi.org/10.3233/JAD-150352>
- Jacobsen, J. S., Wu, C.-C., Redwine, J. M., Comery, T. A., Arias, R., Bowlby, M., ... others. (2006). Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(13), 5161–5166. <http://doi.org/10.1073/pnas.0600948103>
- Jankowsky, J. L. (2005). Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, *25*(21), 5217–5224. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5080-04.2005>

- Johnson, A. J. (2011). Cognitive facilitation following intentional odor exposure. *Sensors*, *11*(12), 5469–5488. <http://doi.org/10.3390/s110505469>
- Johnson, G., & Stoothoff, W. H. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of Cell Science*, *117*(24), 5721–5729. <http://doi.org/10.1242/jcs.01558>
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., ... Malinow, R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron*, *37*(6), 925–937. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00124-7](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00124-7)
- Kandel, E. R. (2012). *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill Medical. Recuperado a partir de <http://ezproxy.viu.ca/login?url=http://lib.myilibrary.com?id=396874>
- Kass, M. D., Guang, S. A., Moberly, A. H., & McGann, J. P. (2015). Changes in olfactory sensory neuron physiology and olfactory perceptual learning after odorant exposure in adult mice. *Chemical Senses*, *bjv065*. <http://doi.org/10.1093/chemse/bjv065>
- Kato, H. K., Gillet, S. N., Peters, A. J., Isaacson, J. S., & Komiyama, T. (2013). Parvalbumin-expressing interneurons linearly control olfactory bulb output. *Neuron*, *80*(5), 1218–1231. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.036>
- Kay, L. M. (2014). Circuit oscillations in odor perception and memory. En *Progress in Brain Research* (Vol. 208, pp. 223–251). Elsevier. Recuperado a partir de <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444633507000097>
- Kay, L. M. (2015). Olfactory system oscillations across phyla. *Current Opinion in Neurobiology*, *31*, 141–147. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2014.10.004>
- Kay, L. M., Beshel, J., Brea, J., Martin, C., Rojas-Líbano, D., & Kopell, N. (2009). Olfactory oscillations: the what, how and what for. *Trends in Neurosciences*, *32*(4), 207–214. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.008>
- Kay, L. M., & Laurent, G. (1999). Odor- and context-dependent modulation of mitral cell activity in behaving rats. *Nature neuroscience*, *2*(11), 1003–1009. <http://doi.org/10.1152/jn.00349.2007>
- Koo, B.-S., Park, K.-S., Ha, J.-H., Park, J. H., Lim, J.-C., & Lee, D.-U. (2003). Inhibitory effects of the fragrance inhalation of essential oil from *Acorus gramineus* on central nervous system. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *26*(7), 978–982.
- Kovács, T. (2004). Mechanisms of olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative disorders. *Ageing Research Reviews*, *3*(2), 215–232. <http://doi.org/10.1016/j.arr.2003.10.003>
- Kurudenkandy, F. R., Zilberter, M., Biverstal, H., Presto, J., Honcharenko, D., Stromberg, R., ... Fisahn, A. (2014). Amyloid- $\beta$ -induced action potential desynchronization and degradation of hippocampal gamma oscillations is prevented by interference with peptide conformation change and aggregation. *Journal of Neuroscience*, *34*(34), 11416–11425. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1195-14.2014>

- Kwok, H. W. M., To, Y. F., & Sung, H. F. (2003). The application of a multisensory Snoezelen room for people with learning disabilities—Hong Kong experience. *Hong Kong Medical Journal*, 9(2), 122–6.
- Labarrera, C., London, M., & Angelo, K. (2013). Tonic inhibition sets the state of excitability in olfactory bulb granule cells: tonic inhibition modulates GC spiking. *The Journal of Physiology*, 591(7), 1841–1850. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.241851>
- LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 8, 499–509. <http://doi.org/10.1038/nrn2168>
- Lagier, S. (2004). Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates oscillations in the rat olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 24(18), 4382–4392. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5570-03.2004>
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., ... others. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6448–6453.
- Lazarini, F., Gabellec, M.-M., Moigneu, C., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., & Lledo, P.-M. (2014). Adult neurogenesis restores dopaminergic neuronal loss in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 34(43), 14430–14442. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5366-13.2014>
- Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y.-P., Lee, V. M.-Y., Hersh, L. B., Sapolsky, R. M., ... Sisodia, S. S. (2005). Environmental enrichment reduces A $\beta$  levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*, 120, 13. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.015>
- LeDoux, J. (2000). Emotion circuits in the brain. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>
- Lehrner, J., Eckersberger, C., Walla, P., Pötsch, G., & Deecke, L. (2000). Ambient odor of orange in a dental office reduces anxiety and improves mood in female patients. *Physiology & Behavior*, 71(1), 83–86.
- Leon, M., Galef, B. G., & Behse, J. H. (1977). Establishment of pheromonal bonds and diet choice in young rats by odor pre-exposure. *Physiology & Behavior*, 18(3), 387–391. [http://doi.org/10.1016/0031-9384\(77\)90248-7](http://doi.org/10.1016/0031-9384(77)90248-7)
- Lepousez, G., Nissant, A., Bryant, A. K., Gheusi, G., Greer, C. A., & Lledo, P.-M. (2014). Olfactory learning promotes input-specific synaptic plasticity in adult-born neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(38), 13984–13989. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.002>
- Levey, A., Lah, J., Goldstein, F., Steenland, K., & Bliwise, D. (2006). Mild cognitive impairment: an opportunity to identify patients at high risk for progression to Alzheimer's disease. *Clinical Therapeutics*, 28(7), 991–1001. <http://doi.org/10.1016/j.clinthera.2006.07.006>
- Liao, K., Liu, D., & Zhu, L.-Q. (2012). Enriched odor exposure decrease tau phosphorylation in the rat hippocampus and cortex. *Neuroscience Letters*, 507(1), 22–26. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.11.040>

- Liu, Q., Li, A., Gong, L., Zhang, L., Wu, N., & Xu, F. (2013). Decreased coherence between the two olfactory bulbs in Alzheimer's disease model mice. *Neuroscience Letters*, *545*, 81–85. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.04.023>
- Livneh, Y., Adam, Y., & Mizrahi, A. (2014). Odor processing by adult-born neurons. *Neuron*, *81*(5), 1097–1110. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.007>
- Lizio, R., Vecchio, F., Frisoni, G. B., Ferri, R., Rodriguez, G., & Babiloni, C. (2011). Electroencephalographic rhythms in Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, *2011*, 1–11. <http://doi.org/10.4061/2011/927573>
- Lledo, P.-M. (2005). Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiological Reviews*, *85*(1), 281–317. <http://doi.org/10.1152/physrev.00008.2004>
- Lledo, P.-M., & Lagier, S. (2006). Adjusting neurophysiological computations in the adult olfactory bulb. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *17*(4), 443–453. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.04.011>
- Lledo, P.-M., & Lazarini, F. (2007). Neuronal replacement in microcircuits of the adult olfactory system. *Comptes Rendus Biologies*, *330*(6–7), 510–520. <http://doi.org/10.1016/j.crv.2007.01.002>
- Lorig, T. S., Herman, K. B., Schwartz, G. E., & Cain, W. S. (1990). EEG activity during administration of low-concentration odors. *Bulletin of the Psychonomic Society*, *28*(5), 405–408. <http://doi.org/10.3758/BF03334051>
- Lowry, C. A., & Kay, L. M. (2007). Chemical factors determine olfactory system beta oscillations in waking rats. *Journal of Neurophysiology*, *98*(1), 394–404. <http://doi.org/10.1152/jn.00124.2007>
- Lue, L.-F., Kuo, Y.-M., Branchova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T. G., ... Rogers, J. (1999). Soluble amyloid  $\beta$  peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*, *155*(3). [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65184-X](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65184-X)
- Lundgaard, I., Li, B., Xie, L., Kang, H., Sanggaard, S., Haswell, J. D. R., ... Nedergaard, M. (2015). Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism. *Nature Communications*, *6*, 6807. <http://doi.org/10.1038/ncomms7807>
- Luzzi, S., Snowden, J. S., Neary, D., Coccia, M., Provinciali, L., & Lambon Ralph, M. A. (2007). Distinct patterns of olfactory impairment in Alzheimer's disease, semantic dementia, frontotemporal dementia, and corticobasal degeneration. *Neuropsychologia*, *45*(8), 1823–1831. <http://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2006.12.008>
- Magavi, S. S. P., Mitchell, B. D., Szentirmai, O., Carter, B. S., & Macklis, J. D. (2005). Adult-Born and Preexisting Olfactory Granule Neurons undergo distinct experience-dependent modifications of their olfactory responses in vivo. *Journal of Neuroscience*, *25*(46), 10729–10739. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2250-05.2005>
- Maioli, F., Coveri, M., Pagni, P., Chiandetti, C., Marchetti, C., Ciarrocchi, R., ... Pedone, V. (2007). Conversion of mild cognitive impairment to dementia in elderly subjects: a preliminary study in a memory and cognitive disorder unit. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, *233*–241. <http://doi.org/10.1016/j.archger.2007.01.032>

- Mandaïron, N., Didier, A., & Linster, C. (2008). Odor enrichment increases interneurons responsiveness in spatially defined regions of the olfactory bulb correlated with perception. *Neurobiology of Learning and Memory*, *90*, 178–184. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.02.008>
- Mandaïron, N., Poncelet, J., Bensafi, M., & Didier, A. (2009). Humans and mice express similar olfactory preferences. *PLoS One*, *4*(1), e4209. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0004209>
- Mandaïron, N., Stack, C., Kiselycznyk, C., & Linster, C. (2006a). Broad activation of the olfactory bulb produces long-lasting changes in odor perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(36), 13543–13548. <http://doi.org/10.3758/s13420-013-0133-7>
- Mandaïron, N., Stack, C., Kiselycznyk, C., & Linster, C. (2006b). Enrichment to odors improves olfactory discrimination in adult rats. *Behavioral Neuroscience*, *120*(1), 173–179. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.120.1.173>
- Mandaïron, N., Stack, C., & Linster, C. (2006). Olfactory enrichment improves the recognition of individual components in mixtures. *Physiology & Behavior*, *89*(3), 379–384. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.07.013>
- Martin, C., Beshel, J., & Kay, L. M. (2007). An olfacto-hippocampal network is dynamically involved in odor-discrimination learning. *Journal of Neurophysiology*, *98*(4), 2196–2205. <http://doi.org/10.1152/jn.00524.2007>
- Martin, C., Gervais, R., Messaoudi, B., & Ravel, N. (2006). Learning-induced oscillatory activities correlated to odour recognition: a network activity: Beta oscillations in the olfactory network. *European Journal of Neuroscience*, *23*(7), 1801–1810. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04711.x>
- Martin, C., & Ravel, N. (2014). Beta and gamma oscillatory activities associated with olfactory memory tasks: different rhythms for different functional networks? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *8*. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00218>
- Martončíková, M., Lievajová, K., Orendáčová, J., Blaško, J., & Račková, E. (2011). Odor enrichment influences neurogenesis in the rostral migratory stream of young rats. *Acta Histochemica*, *113*(3), 326–332. <http://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.01.002>
- Masurkar, A. V., & Devanand, D. P. (2014). Olfactory dysfunction in the elderly: basic circuitry and alterations with normal aging and Alzheimer's disease. *Current Geriatrics Reports*, *3*(2), 91–100. <http://doi.org/10.1007/s13670-014-0080-y>
- Matsutani, S., & Yamamoto, N. (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces rapid morphological changes in dendritic spines of olfactory bulb granule cells in cultured slices through the modulation of glutamatergic signaling. *Neuroscience*, *123*(3), 695–702. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.10.030>
- McDole, B., Isgor, C., Pare, C., & Guthrie, K. (2015). BDNF over-expression increases olfactory bulb granule cell dendritic spine density in vivo. *Neuroscience*, *304*, 146–160. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.056>

- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology*, *34*, 939–944. <http://doi.org/10.1212/WNL.34.7.939>
- McTavish, T. S., Migliore, M., Shepherd, G. M., & Hines, M. L. (2012). Mitral cell spike synchrony modulated by dendrodendritic synapse location. *Frontiers in Computational Neuroscience*, *6*. <http://doi.org/10.3389/fncom.2012.00003>
- Meshulam, R. I., Moberg, P. J., Mahr, R. N., & Doty, R. L. (1998). Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Archives of neurology*, *55*(1), 84–90. <http://doi.org/10.1001/archneur.55.1.84>
- Michail, G., Dresel, C., Witkovský, V., Stankewitz, A., & Schulz, E. (2016). Neuronal Oscillations in Various Frequency Bands Differ between Pain and Touch. *Frontiers in Human Neuroscience*, *10*. <http://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00182>
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., ... Axel, R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, *87*(4), 675–686. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81387-2](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81387-2)
- Mori, K. (2006). Maps of odorant molecular features in the mammalian olfactory bulb. *Physiological Reviews*, *86*(2), 409–433. <http://doi.org/10.1152/physrev.00021.2005>
- Mori, K., Matsumoto, H., Tsuno, Y., & Igarashi, K. M. (2009). Dendrodendritic synapses and functional compartmentalization in the olfactory bulb. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1170*(1), 255–258. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.03881.x>
- Morris, R. G., & Salmon, D. P. (2007). The centennial of Alzheimer's disease and the publication of “über eine eigenartige erkankung der hirnrinde” by Alois Alzheimer. *Cortex*, *43*(7), 821–825. [http://doi.org/10.1016/S0010-9452\(08\)70681-6](http://doi.org/10.1016/S0010-9452(08)70681-6)
- Mueller, S. G., Weiner, M. W., Thal, L. J., Petersen, R. C., Jack, C. R., Jagust, W., ... Beckett, L. (2005). Ways toward an early diagnosis in Alzheimer's disease: The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). *Alzheimer's & Dementia*, *1*(1), 55–66. <http://doi.org/10.1016/j.jalz.2005.06.003>
- Murphy, C. (1999). Loss of olfactory function in dementing disease. *Physiology & behavior*, *66*(2), 177–182. [http://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00262-5](http://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00262-5)
- Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, *8*. <http://doi.org/10.3389/fncir.2014.00098>
- Nelson, P. T., Alafuzoff, I., Bigio, E. H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N. J., ... Beach, T. G. (2012). Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *71*(5), 362–381. <http://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825018f7>
- Nicola-Antoniou, I. (2011). Olfactory dysfunctions in Alzheimer's disease. En *Olfactory dysfunctions in Alzheimer's disease*. INTECH Open Access Publisher. Recuperado a partir de <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/19241.pdf>

- Nithianantharajah, J. (2004). Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81(3), 200–210. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.02.002>
- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), 697–709. <http://doi.org/10.1038/nrn1970>
- Nyberg, S., Jönhagen, M. E., Cselényi, Z., Halldin, C., Julin, P., Olsson, H., ... Farde, L. (2009). Detection of amyloid in Alzheimer's disease with positron emission tomography using [11C]AZD2184. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 36(11), 1859–1863. <http://doi.org/10.1007/s00259-009-1182-1>
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., ... LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409–421. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- Ohm, T. G., & Braak, H. (1987). Olfactory bulb changes in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 73(4), 365–369. <http://doi.org/10.1007/BF00688261>
- Oliveira, F. H. de, Rodrigues Neto, E., Fonseca, M. K., Costa, A. S. R. da, Rockenbach, M. A. B. C., Padilha, R. dos S., ... Hilbig, A. (2015). Neurodegenerative changes in the brainstem and olfactory bulb in people older than 50 years old: a descriptive study. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 73(7), 569–577. <http://doi.org/10.1590/0004-282X20150066>
- Palop, J. J., Chin, J., Roberson, E. D., Wang, J., Thwin, M. T., Bien-Ly, N., ... Mucke, L. (2007). Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron*, 55(5), 697–711. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.025>
- Palop, J. J., & Mucke, L. (2010). Amyloid- $\beta$ -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nature Neuroscience*, 13(7), 812–818. <http://doi.org/10.1038/nn.2583>
- Parker, A., Ngu, H., & Cassaday, H. J. (2001). Odour and proustian memory: reduction of context-dependent forgetting and multiple forms of memory. *Applied Cognitive Psychology*, 15(2), 159–171.
- Peña-Ortega, F. (2013). Amyloid beta-protein and neural network dysfunction. *Journal of Neurodegenerative Diseases*, 2013, 1–8. <http://doi.org/10.1155/2013/657470>
- Peña-Ortega, F., & Bernal-Pedraza, R. (2012). Amyloid beta peptide slows down sensory-induced hippocampal oscillations. *International journal of peptides*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/236289>
- Peña-Ortega, F., Gutiérrez-Lerma, A. I., Quiroz-Baez, R., & Arias, C. (2006). The role of  $\beta$ -Amyloid protein in synaptic function implications for Alzheimer's disease therapy. *Current Neuropharmacology*, 4, 149–163. <http://doi.org/10.2174/157015906776359531>
- Peña-Ortega, F., Ordaz, B., Balleza-Tapia, H., Bernal-Pedraza, R., Márquez-Ramos, A., Carmona-Aparicio, L., & Giordano, M. (2010). Beta-amyloid protein (25-35) disrupts

- hippocampal network activity: Role of FYN-kinase. *Hippocampus*, 78–96. <http://doi.org/10.1002/hipo.20592>
- Peña-Ortega, F., Solis-Cisneros, A., Ordaz, B., Balleza-Tapia, H., & Lopez-Guerrero, J. J. (2012). Amyloid beta 1-42 inhibits entorhinal cortex activity in the beta-gamma range: role of GSK-3. *Current Alzheimer Research*, 9(7), 857–863. <http://doi.org/10.2174/156720512802455403>
- Pettit, D. L., & Yakel, J. L. (2001).  $\beta$ -amyloid1-42 peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *The Journal of Neuroscience*, 21, 1–5.
- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G. C., Wu, Y.-T., & Prina, M. (2015). The global impact of dementia: an analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's Disease International*.
- Proud, C. G. (2007). Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochemical Journal*, 403(2), 217–234. <http://doi.org/10.1042/BJ20070024>
- Purves, D., Augustine, Fitzpatrick, Hall, LaMantia, & Williams. (2008). *Neurociencia* (3ra edición). Panamericana.
- Puzzo, D., Privitera, L., Fa', M., Staniszewski, A., Hashimoto, G., Aziz, F., ... Arancio, O. (2011). Endogenous amyloid- $\beta$  is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Annals of Neurology*, 69(5), 819–830. <http://doi.org/10.1002/ana.22313>
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fa, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., & Arancio, O. (2008). Picomolar amyloid-positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 28(53), 14537–14545. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008>
- Rawson, N. E., Gomez, G., Cowart, B. J., Kriete, A., Pribitkin, E., & Restrepo, D. (2012). Age-associated loss of selectivity in human olfactory sensory neurons. *Neurobiology of Aging*, 33(9), 1913–1919. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.036>
- Reitz, C., Brayne, C., & Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 7(3), 137–152. <http://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.2>
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L., & Buck, L. B. (1994). A molecular dissection of spatial patterning in the olfactory system. *Current Opinion in Neurobiology*, 4, 588–506. [http://doi.org/10.1016/0959-4388\(94\)90061-2](http://doi.org/10.1016/0959-4388(94)90061-2)
- Rey, N. L., Sacquet, J., Veyrac, A., Jourdan, F., & Didier, A. (2012). Behavioral and cellular markers of olfactory aging and their response to enrichment. *Neurobiology of Aging*, 33(3), 626.e9-626.e23. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.026>
- Rochefort, C., Gheusi, G., Vincent, J.-D., & Lledo, P.-M. (2002). Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *The Journal of neuroscience*, 22(7), 2679–2689.
- Rodriguez, J. J. ., Noristani, H. N., Olabarria, M., Fletcher, J., Somerville, T. T. D., Yeh, C. Y., & Verkhatsky, A. (2011). Voluntary running and environmental enrichment restores impaired hippocampal neurogenesis in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's

- disease. *Current Alzheimer Research*, 8(7), 707–717.  
<http://doi.org/10.2174/156720511797633214>
- Rojas-Líbano, D., & Kay, L. M. (2008). Olfactory system gamma oscillations: the physiological dissection of a cognitive neural system. *Cognitive Neurodynamics*, 2(3), 179–194.  
<http://doi.org/10.1007/s11571-008-9053-1>
- Root, C. M., Denny, C. A., Hen, R., & Axel, R. (2014). The participation of cortical amygdala in innate, odour-driven behaviour. *Nature*, 515(7526), 269–273.  
<http://doi.org/10.1038/nature13897>
- Saiz-Sanchez, D., De La Rosa-Prieto, C., Ubeda-Bañon, I., & Martinez-Marcos, A. (2013). Interneurons and beta-amyloid in the olfactory bulb, anterior olfactory nucleus and olfactory tubercle in APPxPS1 transgenic mice model of Alzheimer's disease: interneurons and A $\beta$  in APPx PS1 mouse. *The Anatomical Record*, 296(9), 1413–1423.  
<http://doi.org/10.1002/ar.22750>
- Saiz-Sanchez, D., Ubeda-Bañon, I., la Rosa-Prieto, D., & Martinez-Marcos, A. (2012). Differential expression of interneuron populations and correlation with amyloid- $\beta$  deposition in the olfactory cortex of an A $\beta$ PP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 31(1), 113–129.  
<http://doi.org/10.3233/JAD-2012-111889>
- Salgado-Puga, K., & Peña-Ortega, F. (2015). Cellular and network mechanisms underlying memory impairment induced by amyloid  $\beta$  protein. *Protein and peptide letters*, 22(4), 303–321. <http://doi.org/10.2174/0929866522666150202112154>
- Salgado-Puga, K., Prado-Alcalá, R. A., & Peña-Ortega, F. (2015). Amyloid  $\beta$  enhances typical rodent behavior while it impairs contextual memory consolidation. *Behavioural Neurology*, 2015, 1–12. <http://doi.org/10.1155/2015/526912>
- Secretaría de Salud. (2015). *Boletín Epidemiológico* (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica No. 36) (pp. 1–64). México. Recuperado a partir de <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx>
- Selkoe, D. J. (2000). Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 924(1), 17–25.  
<http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05554.x>
- Selkoe, D. J., Triller, A., & Christen, Y. (Eds.). (2008). *Synaptic plasticity and the mechanism of Alzheimer's disease*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Recuperado a partir de <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-76330-7>
- Shapiro, L. A., Ng, K. L., Zhou, Q.-Y., & Ribak, C. E. (2007). Olfactory enrichment enhances the survival of newly born cortical neurons in adult mice. *Neuroreport*, 18(10), 981–985.  
<http://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3281532bc1>
- Shepherd, G. M., Chen, W. R., Willhite, D., Migliore, M., & Greer, C. A. (2007). The olfactory granule cell: from classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain Research Reviews*, 55(2), 373–382. <http://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.03.005>

- Shepherd, G. M., & Grillner, S. (Eds.). (2010). *Handbook of brain microcircuits*. New York: Oxford University Press.
- Shepherd, G.M. (1972). Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiological Reviews*, 52(4), 54.
- Shin, J., Lee, S.-Y., Kim, S.-H., Kim, Y.-B., & Cho, S.-J. (2008). Multitracer PET imaging of amyloid plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *NeuroImage*, 43(2), 236–244. <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.07.022>
- Shipton, O. A., Leitz, J. R., Dworzak, J., Acton, C. E. J., Tunbridge, E. M., Denk, F., ... Vargas-Caballero, M. (2011). Tau protein is required for amyloid -induced impairment of hippocampal long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 31(5), 1688–1692. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2610-10.2011>
- Small, B. J., Herlitz, A., & Bäckman, L. (1998). Cognitive development in Alzheimer's disease: charting the decline process. En *Comprehensive clinical psychology: Clinical geropsychology* (Vol. 7, pp. 231–245). Oxford: Elsevier.
- Smith, J. O. (2011). Hamming Window. Recuperado a partir de [http://ccrma.stanford.edu/~jos/sasp/Hamming\\_Window.html](http://ccrma.stanford.edu/~jos/sasp/Hamming_Window.html), online book, 2011 edition
- Stamps, J. J., Bartoshuk, L. M., & Heilman, K. M. (2013). A brief olfactory test for Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 333(1–2), 19–24. <http://doi.org/10.1016/j.jns.2013.06.033>
- Sullivan, S. L., Ressler, K. J., & Buck, L. B. (1995). Spatial patterning and information coding in the olfactory system. *Current Opinion in Genetics & Development*, 5, 516–523. <http://doi.org/10.1093/chemse/bjq029>
- Sun, M.-K., & Alkon, D. L. (2002). Impairment of hippocampal CA1 heterosynaptic transformation and spatial memory by  $\beta$ -amyloid25–35. *Journal of Neurophysiology*, 87(5), 2441–2449. <http://doi.org/10.1152/jn.00230.2001>
- Thompson, M. D., Knee, K., & Golden, C. J. (1998). Olfaction in persons with Alzheimer's disease. *Neuropsychology review*, 8(1), 11–23. <http://doi.org/10.1023/A:1025627106073>
- Tong, M. T., Peace, S. T., & Cleland, T. A. (2014). Properties and mechanisms of olfactory learning and memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00238>
- Valero, J., España, J., Parra-Damas, A., Martín, E., Rodríguez-Álvarez, J., & Saura, C. A. (2011). Short-term environmental enrichment rescues adult neurogenesis and memory deficits in APPSw,Ind transgenic mice. *PLoS ONE*, 6(2), e16832. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0016832>
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of enviromental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(3), 191–198. <http://doi.org/10.1038/35044558>
- van Wingerden, M., Vinck, M., Lankelma, J. V., & Pennartz, C. M. A. (2010). Learning-Associated Gamma-Band Phase-Locking of Action-Outcome Selective Neurons in Orbitofrontal Cortex. *Journal of Neuroscience*, 30(30), 10025–10038. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0222-10.2010>

- Varela, C., Llano, D. A., & Theyel, B. B. (2011). An Introduction to In Vitro Slice Approaches for the Study of Neuronal Circuitry. En T. Fellin & M. Halassa (Eds.), *Neuronal Network Analysis* (Vol. 67, pp. 103–125). Totowa, NJ: Humana Press. Recuperado a partir de [http://link.springer.com/10.1007/7657\\_2011\\_19](http://link.springer.com/10.1007/7657_2011_19)
- Verret, L., Mann, E. O., Hang, G. B., Barth, A. M. I., Cobos, I., Ho, K., ... Palop, J. J. (2012). Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell*, *149*(3), 708–721. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.046>
- Veyrac, A., Sacquet, J., Nguyen, V., Marien, M., Jourdan, F., & Didier, A. (2009). Novelty determines the effects of olfactory enrichment on memory and neurogenesis through noradrenergic mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, *34*, 786–795. <http://doi.org/10.1038/npp.2008.191>
- Vincis, R., Gschwend, O., Bhaukaurally, K., Beroud, J., & Carleton, A. (2012). Dense representation of natural odorants in the mouse olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, *15*(4), 537–539. <http://doi.org/10.1038/nn.3057>
- Wachowiak, M., & Shipley, M. T. (2006). Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *17*(4), 411–423. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.04.007>
- Warner, M. D., Peabody, C. A., Flattery, J. J., & Tinklenberg, J. R. (1986). Olfactory deficits and Alzheimer's diseases. *Biology Psychiatry*, *21*, 116–118. <http://doi.org/10.3233/JAD-2010-100696>
- Watt, W. C., Sakano, H., Lee, Z.-Y., Reusch, J. E., Trinh, K., & Storm, D. R. (2004). Odorant stimulation enhances survival of olfactory sensory neurons via MAPK and CREB. *Neuron*, *41*, 955–967. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00075-3](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00075-3)
- Wesson, D. W., Levy, E., Nixon, R. A., & Wilson, D. A. (2010). Olfactory dysfunction correlates with amyloid- $\beta$  burden in an Alzheimer disease Model. *Journal of Neuroscience*, *30*(2). <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4622-09.2010>
- Wesson, D. W., Morales-Corraliza, J., Mazzella, M. J., Wilson, D. A., & Mathews, P. M. (2013). Chronic anti-murine A $\beta$  immunization preserves odor guided behaviors in an Alzheimer's  $\beta$ -amyloidosis model. *Behavioural Brain Research*, *237*, 96–102. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.09.019>
- Wesson, D. W., Nixon, R. A., Levy, E., & Wilson, D. A. (2011). Mechanisms of neural and behavioral dysfunction in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, *43*(3), 163–179. <http://doi.org/10.1007/s12035-011-8177-1>
- Weuve, J., Hebert, L. E., Scherr, P. A., & Evans, D. A. (2015). Prevalence of Alzheimer Disease in US States: *Epidemiology*, *26*(1), e4–e6. <http://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000199>
- Weuve, J., Proust-Lima, C., Power, M. C., Gross, A. L., Hofer, S. M., Thiébaud, R., ... Dufouil, C. (2015). Guidelines for reporting methodological challenges and evaluating potential bias in dementia research. *Alzheimer's & Dementia*, *11*(9), 1098–1109. <http://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.06.1885>

- Wilson, D. A., Sullivan, R. M., & Leon, M. (1985). Odor familiarity alters mitral cell response in the olfactory bulb of neonatal rats. *Odor Familiarity Alters Mitral Cell Response in the Olfactory Bulb of Neonatal Rats*, 22, 314–317. [http://doi.org/10.1016/0165-3806\(85\)90186-5](http://doi.org/10.1016/0165-3806(85)90186-5)
- Wilson, R. S., Arnold, S. E., Schneider, J. A., Boyle, P. A., Buchman, A. S., & Bennett, D. A. (2009). Olfactory impairment in presymptomatic Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170(1), 730–735. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04013.x>
- Wolfe, M. S. (2002). Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(11), 859–866. <http://doi.org/10.1038/nrd938>
- Woo, C. C., Coopersmith, R., & Leon, Michael. (1987). Localized changes in olfactory bulb morphology associated with early olfactory learning. *The Journal of Comparative Neurology*, 263, 113–125. <http://doi.org/10.1002/cne.902630110>
- Woo, C. C., & Leon, M. (1995). Early olfactory enrichment and deprivation. *The Journal of Comparative Neurology*, 360, 634–642. <http://doi.org/10.1002/cne.903600408>
- Xu, Z., Wang, L., Chen, G., Rao, X., & Xu, F. (2013). Roles of GSK3 $\beta$  in odor habituation and spontaneous neural activity of the mouse olfactory bulb. *PLoS ONE*, 8(5), e63598. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0063598>
- Yaksi, E., & Wilson, R. I. (2010). Electrical coupling between olfactory glomeruli. *Neuron*, 67(6), 1034–1047. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.041>
- Yang, M., & Crawley, J. N. (2009). Simple behavioral assessment of mouse olfaction. En J. N. Crawley, C. R. Gerfen, M. A. Rogawski, D. R. Sibley, P. Skolnick, & S. Wray (Eds.), *Current Protocols in Neuroscience*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Recuperado a partir de <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142301.ns0824s48>
- Young, J. W., Sharkey, J., & Finlayson, K. (2009). Progressive impairment in olfactory working memory in a mouse model of Mild Cognitive Impairment. *Neurobiology of Aging*, 30(9), 1430–1443. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.11.018>
- Yuan, Q., & Knöpfel, T. (2006). Olfactory nerve stimulation-evoked mGluR1 slow potentials, oscillations, and calcium Signaling in mouse olfactory bulb mitral cells. *Journal of Neurophysiology*, 95(5), 3097–3104. <http://doi.org/10.1152/jn.00001.2006>
- Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular brain*, 4(1), 3. <http://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>