



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**INFLUENCIA DEL ENRIQUECIMIENTO OLFATORIO SOBRE LA ACTIVACIÓN DEL CIRCUITO  
BULBAR *IN VIVO*.**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA:

**BIÓLOGA REBECA HERNÁNDEZ SOTO**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA**

DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGÍA DEL DESARROLLO Y NEUROFISIOLOGÍA  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
CAMPUS UNAM JURQUILLA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**DR. PAVEL ERNESTO RUEDA OROZCO**

DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGÍA DEL DESARROLLO Y NEUROFISIOLOGIA  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
CAMPUS UNAM JURQUILLA

**DRA. MÓNICA ANDREA LÓPEZ HIDALGO**

FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

JURIQUILLA QUERÉTARO, JUNIO, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



*Esta tesis fue realizada en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología al cual pertenece el laboratorio C-01 Circuitos Neuronales, a cargo del Dr. José Fernando Peña Ortega.*

*Para la realización de este proyecto se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con los proyectos no. 117 y 235789, de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México con el proyecto no. IN202018 y de la Cátedra Marcos Moshinsky.*

*Así mismo se contó con el apoyo de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de becario 664903.*

*Por mi raza  
hablará el espíritu*

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

A la Universidad Nacional Autónoma de México-UNAM, y al Instituto de Neurobiología por permitirme tener una formación profesional como Maestra en Ciencias (Neurobiología).

Al Dr. Fernando Peña por sus enseñanzas, por su paciencia, por su apoyo y su motivación para que pudiera aprender el manejo y análisis de las técnicas en esta tesis, vaya que ha sido un gran reto.

Al Dr. Benito Ordaz, a quien considero un amigo, por sus bromas, su apoyo y su motivación en los momentos difíciles, y además por ser alguien de quien he aprendido mucho en el ámbito de la electrofisiología.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Pavel Ernesto Rueda y la Dra. Mónica Andrea López por sus valiosas críticas en la realización de este proyecto cada semestre.

A la Dra. Deisy Gasca Martínez de la Unidad de Análisis Conductual (Laboratorio B-12) del Instituto de Neurobiología UNAM Campus Juriquilla Querétaro, por permitirme hacer uso de la unidad de conducta para las pruebas efectuadas en esta tesis.

A la Dra. Alejandra Castilla León y al M.V.Z. José Martín García Servín responsables del Bioterio, por el apoyo en el alojamiento y cuidado de los ratones empleados en este proyecto.

A la M.C Leonor Casanova Rico de la Unidad de Enseñanza por el apoyo administrativo durante la maestría.

*¡POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU!*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, a quienes amo profundamente, Gloria Soto y Jorge Hernández, quienes siguen alentándome con paciencia y amor, para continuar con lo que más me apasiona, hacer ciencia. Y quienes, a pesar de la distancia, y vaya que ha sido mucha en algunas ocasiones, me han apoyado para concluir con esta etapa en mi desarrollo profesional.

A mis hermanas Angélica y Vanesa quienes son mis cómplices, amigas, mis guías, y unos de los mejores ejemplos de vida que conozco, gracias por todo lo que me han enseñado. Angélica por ser tan paciente y mi más grande apoyo. Y a Vanesita por sus sonrisas que iluminan los días malos.

A Benjamín, mi cómplice de vida, por la motivación en los momentos complicados, por sus consejos y su ejemplo de que para hacer ciencia el ingrediente esencial es la imaginación. Y más aún por permitirme aprender a su lado las cosas bellas de la vida.

A los integrantes del laboratorio a quienes considero mis amigos y de quienes he aprendido mucho, Keila Rojas, Karla Salgado, Estefanía Guerrero, Lourdes Enriquez, Guadalupe Manrique, Polet Camacho, Jonathan Lorea, José María Cornejo, Karen Pimenel, Arturo Isla, Josué Juárez, Victor Vargas, David Alcántara, Martín Macías, Perla González, Anahí Salas, Eduardo Morado, Ernesto Flores, Kenia Pardo, Mayra, Felipe, Angélica Quintana, Lorena Xolalpa, Carlos Montalvo, Siddhartha Mondragón.

“Yo soy de las que piensan que la ciencia tiene gran belleza”

“No puedes esperar construir un mundo mejor sin mejorar a los individuos. Con ese fin, cada uno de nosotros debe trabajar para mejorarse a uno mismo y, al mismo tiempo, compartir una responsabilidad general para con toda la humanidad, siendo nuestra responsabilidad particular ayudar a aquellos para quienes creemos que podemos resultar más útiles.”

**María Salomea Skłodowska-Curie.** Premio nobel en física, 1903.

## RESUMEN

El sistema olfatorio forma parte de uno de los sistemas sensoriales más antiguos y conservados a lo largo de la evolución. Su funcionalidad depende de diferentes estructuras en la periferia y en el sistema nervioso central (SNC). Una de estas estructuras es el bulbo olfatorio, que constituye el primer relevo en el SNC para la identificación, discriminación y percepción aromática. Como muchos otros circuitos en el SNC, el bulbo olfatorio puede tener modificaciones en su estructura y en sus interacciones neuronales en respuesta a estimulaciones sensoriales crónicas y agudas. Entre estas estimulaciones se encuentra el enriquecimiento olfatorio (EO), que consiste en una exposición pasiva y prolongada a una gama amplia de aromas. Recientemente, el EO ha demostrado tener efectos benéficos en pacientes con enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer. Hallazgos de nuestro laboratorio indican que el EO protege al bulbo olfatorio contra los efectos inhibitorios del péptido beta amiloide, mismo que es sobreproducido durante la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de los cambios plásticos en el bulbo olfatorio inducidos por el EO y se desconocen los cambios en las interacciones de los diferentes tipos neuronales del circuito bulbar. Por ello, en este trabajo nos planteamos averiguar las modificaciones de la red bulbar producto del EO. Para este fin se utilizaron técnicas de imagenología óptica intrínseca y registros electrofisiológicos con multielectrodos. Nuestro trabajo demuestra que el EO reduce el número e incrementa el tamaño de los glomérulos activados con aromas novedosos y familiares. Así mismo, el EO incrementa la potencia relativa en las bandas de frecuencia beta y gamma, mientras que la disminuye en la banda delta, en las capas más profundas del bulbo olfatorio, como la capa mitral y granular. La coherencia bulbar en las bandas de frecuencia lentas (delta, theta y beta) aumenta, mientras que en la banda gamma disminuye después del EO. La tasa de disparo de las neuronas del bulbo olfatorio incrementa después del EO en condiciones basales, mientras que la correlación del disparo entre pares de neuronas también aumenta. Finalmente, encontramos que el EO mejora la detección y la discriminación de aromas en pruebas conductuales. En conjunto, este trabajo muestra que el EO genera cambios funcionales en la red bulbar que favorecen la respuesta a los estímulos olfatorios.

## **ABSTRACT**

The olfactory system is part of one of the oldest and most conserved sensory systems throughout evolution. Its functionality depends on different structures in the periphery and in the central nervous system (CNS). One of these structures is the olfactory bulb, which constitutes the first relay in the CNS for the identification, discrimination and perception of odors. As many other circuits in the CNS, the olfactory bulb can undergo modifications in its structure and neuronal interactions in response to chronic and acute sensory stimulation. One of these stimulations is olfactory enrichment (EO), which consisting of passive and prolonged exposure to a wide range of odors. Recently, EO has been shown to produce beneficial effects in patients with neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's diseases. Recent findings from our laboratory indicate that EO protects the olfactory bulb against the inhibitory effects of amyloid beta peptide, which is overproduced during Alzheimer's disease. However, very little is known about the plastic changes in the olfactory bulb after the EO and nothing is known about the changes in the interactions of the different neuronal types of the bulbar circuit. For this reason, in this work we evaluate the modifications of the bulbar network produced by the EO. The foregoing, using the use of intrinsic optical imaging techniques and electrophysiological recordings with multielectrodes. Our work indicates that the EO reduces the number and increases the size of the glomeruli activated with novel and familiar odors. Likewise, EO increases the relative power in the beta and gamma frequency bands, while decreasing it in the delta band, in the deeper layers of the olfactory bulb. The bulbar coherence in the slow frequency bands (delta, theta and beta) increases, while in the gamma band it decreases after the EO. The firing rate of the olfactory bulb neurons increases after the EO at baseline conditions, while the firing correlation between pairs of neurons also increases. Finally, we found that EO improves odor detection and discrimination in behavioral tests. Overall, this work shows that the EO generates functional changes in the bulbar network that increase the response to olfactory stimuli.

## ABREVIATURAS

- **AMPC** Adenosina Monofosfato Cíclica
- **BOP** Bulbo Olfatorio Principal
- **BOLD MRI** Imagen De Resonancia Magnética Funcional Tipo *BOLD* (Por sus siglas en inglés)
- **βA** Proteína Beta Amiloide
- **CG** Capa Granular Del Bulbo Olfatorio
- **CGR** Célula Granular Del Bulbo Olfatorio
- **CGL** Capa Glomerular Del Bulbo Olfatorio
- **CM** Capa Mitral Del Bulbo Olfatorio
- **CROSS-X** Correlación Cruzada
- **CPE** Capa Plexiforme Externa Del Bulbo Olfatorio
- **CPI** Capa Plexiforme Interna Del Bulbo Olfatorio
- **PG** Célula Periglomerular Del Bulbo Olfatorio
- **DSA** Células De Axón Corto Profundas (Por sus siglas en inglés)
- **EA** Enfermedad De Alzheimer
- **ET** Células Empenachadas Externas (Por sus siglas en inglés)
- **EO** Enriquecimiento Olfatorio
- **MT** Células Mitrales
- **NSO** Neuronas Sensoriales Olfatorias
- **PGe** Célula Periglomerular Regulada Por Células Empenachadas Externas
- **PGo** Célula Periglomerular Regulada Por Neuronas Sensoriales Olfatorias
- **PR** Potencia Relativa

- **SSA** Células Superficiales De Axón Corto (Por sus siglas en inglés)
- **SUA** Actividad Unitaria (Por sus siglas en inglés)
- **MUA** Actividad Multiunitaria (Por sus siglas en inglés)

## INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>ABREVIATURAS</b> .....	8
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	12
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	15
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	16
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	18
2.1 El sistema olfatorio.....	18
2.2 El bulbo olfatorio principal (BOP) .....	20
2.3 Integración de la información olfatoria. ....	23
2.4 Propiedades electrofisiológicas del BOP.....	25
2.5 Interacciones neuronales en el BOP .....	26
2.6 El enriquecimiento olfatorio.....	27
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	31
<b>4. HIPOTESIS</b> .....	32
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	32
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	32
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	33
7.1 Animales.....	33
7.2 Enriquecimiento olfatorio.....	33
7.3 Craneotomía en el BOP para la imagenología de señal intrínseca. ....	34
7.4 Imágenes de señal intrínseca en el BOP.....	34
7.5 Registros con multielectrodos en animales anestesiados. ....	36
7.6 Prueba de alimento enterrado. ....	37
7.7 Prueba de Habituaación-deshabituaación olfatoria.....	37
7.8 Análisis de datos y análisis estadístico.....	38
<b>8. RESULTADOS</b> .....	44

8.1 Efecto del EO sobre el patrón de activación de la capa glomerular del BOP inducida por aromas.....	44
8.2 Evaluación del efecto del EO sobre la actividad poblacional en las distintas capas del BOP .....	50
8.3 Evaluación del efecto del EO sobre la red olfatoria bulbar.....	58
8.4 Evaluación del efecto del EO sobre la detección y discriminación olfatorias.....	64
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>68</b>
<b>10. CONCLUSIONES .....</b>	<b>81</b>
<b>11. REFERENCIAS .....</b>	<b>82</b>
<b>12. ANEXOS .....</b>	<b>99</b>
12.1 Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la coherencia de la actividad eléctrica bulbar espontánea. ....	99
12.2 Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la coherencia de la actividad eléctrica bulbar inducida con acetato de amilo al 99%. ....	100
12.3 Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la coherencia de la actividad eléctrica bulbar inducida con esencia de canela. ....	101
12.4 Efecto de la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99% sobre la coherencia de la actividad eléctrica bulbar en animales control. ....	102
12.5 Efecto de la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99% sobre la coherencia de la actividad eléctrica bulbar en animales enriquecidos olfatoriamente. ....	103
12.6 Efecto de la estimulación olfatoria con esencia de canela sobre la coherencia de la actividad eléctrica bulbar en animales control. ....	104
12.7 Efecto de la estimulación olfatoria con esencia de canela sobre la coherencia de la actividad eléctrica bulbar en animales enriquecidos olfatoriamente. ....	105

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Epitelio olfatorio en humanos.	19
<b>Figura 2.</b> Vías neuronales en el sistema olfatorio.	22
<b>Figura 3.</b> Imagen del bulbo olfatorio de la rata con resonancia magnética funcional adquirida durante la exposición continua a acetato de amilo.	23
<b>Figura 4.</b> Imagenología óptica de señales intrínsecas inducidas con dos odorantes.	24
<b>Figura 5.</b> Efecto protector del enriquecimiento olfatorio (EO) sobre la actividad eléctrica de la capa granular del BOP en presencia de la proteína $\beta$ A.	30
<b>Figura 6.</b> Análisis de la coherencia de la actividad bulbar.	39
<b>Figura 7.</b> Imagen óptica intrínseca bulbar.	43
<b>Figura 8.</b> Patrón de activación glomerular de la superficie dorsal del BOP tras la estimulación con acetato de amilo al 99% en animales control y enriquecidos olfatoriamente.	45
<b>Figura 9.</b> Patrón de activación glomerular de la superficie dorsal del BOP tras la estimulación con esencia de canela en animales control y enriquecidos olfatoriamente.	47
<b>Figura 10.</b> Dinámica de la activación glomerular y posición de los glomérulos durante la estimulación con esencia de canela en animales control y animales enriquecidos olfatoriamente.	49
<b>Figura 11.</b> Modificaciones en el potencial local de campo de producidos por el EO.	51
<b>Figura 12.</b> Modificaciones en la potencia relativa (PR) de la actividad espontánea de animales EO y controles en las distintas bandas de frecuencia.	52
<b>Figura 13.</b> Modificaciones en la potencia relativa (PR) de la actividad inducida tras la estimulación con acetato de amilo al 99% de animales EO y controles en las distintas bandas de frecuencia.	53
<b>Figura 14.</b> Modificaciones en la potencia relativa (PR) de la actividad inducida tras la estimulación con esencia de canela en animales EO y controles en las distintas bandas de frecuencia.	54
<b>Figura 15.</b> Efecto del EO sobre la coherencia intrabulbar de las oscilaciones espontáneas poblacionales en la frecuencia gamma rápido (80-200 Hz) en animales control (A) y EO (B).	55

<b>Figura 16.</b> Efecto del EO sobre la coherencia intrabulbar de las oscilaciones poblacionales inducidas por acetato de amilo al 99% en la frecuencia gamma rápido (80-200 Hz) en animales control (A) y EO (B).	56
<b>Figura 17.</b> Efecto del EO sobre la coherencia intrabulbar de las oscilaciones poblacionales inducidas por esencia de canela en la frecuencia gamma rápido (80-200 Hz) en animales control (A) y EO (B).	57
<b>Figura 18.</b> Frecuencia de disparo de la actividad espontánea e inducida con aromas de animales EO y controles.	59
<b>Figura 19.</b> Efectos del EO sobre las interacciones funcionales entre las neuronas del circuito bulbar.	60
<b>Figura 20.</b> Efectos del EO sobre las interacciones funcionales entre las neuronas del circuito bulbar durante la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99%.	62
<b>Figura 21.</b> Efectos del EO sobre las interacciones funcionales entre las neuronas del circuito bulbar durante la estimulación olfatoria con esencia de canela.	63
<b>Figura 22.</b> Evaluación de la capacidad olfatoria mediante la prueba de alimento enterrado.	65
<b>Figura 23.</b> Evaluación de la discriminación y aprendizaje olfatorios mediante la prueba de habituación- deshabituación.	66
<b>Figura 24.</b> Evaluación del peso corporal de los animales sometidos a EO.	67
<b>Figura 25.</b> Especulaciones acerca del efecto del enriquecimiento olfatorio sobre el circuito bulbar.	80
<b>Figura 26.</b> Coherencia intrabulbar de las oscilaciones espontáneas poblacionales en distintas bandas de frecuencia en animales control (A) y EO (B)	99
<b>Figura 27.</b> Coherencia intrabulbar de las oscilaciones poblacionales inducidas por acetato de amilo al 99% en distintas bandas de frecuencia en animales control (A) y EO (B).	100
<b>Figura 28.</b> Coherencia intrabulbar de las oscilaciones poblacionales inducidas por esencia de canela en distintas bandas de frecuencia en animales control (A) y EO (B).	101
<b>Figura 29.</b> Efecto de la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99% (B) sobre la coherencia intrabulbar de las oscilaciones espontáneas (A) en distintas bandas de frecuencia en animales control.	102
<b>Figura 30.</b> Efecto de la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99% (B) sobre la coherencia intrabulbar de las oscilaciones espontáneas (A) en distintas bandas de frecuencia en animales EO.	103

**Figura 31.** Efecto de la estimulación olfatoria con esencia de canela (B) sobre la coherencia intrabulbar de las oscilaciones espontáneas (A) en distintas bandas de frecuencia en animales control. 104

**Figura 32.** Efecto de la estimulación olfatoria con esencia de canela (B) sobre la coherencia intrabulbar de las oscilaciones espontáneas (A) en distintas bandas de frecuencia en animales EO. 105

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Parámetros de la red bulbar obtenida de los análisis de correlación del disparo durante la actividad espontánea.	61
<b>Tabla 2.</b> Parámetros de la red bulbar obtenida de los análisis de correlación del disparo durante la actividad inducida con acetato de amilo al 99%.	63
<b>Tabla 3.</b> Parámetros de la red bulbar obtenida de los análisis de correlación del disparo durante la actividad inducida con esencia de canela.	64

## 1. INTRODUCCIÓN

El sistema olfatorio es altamente dinámico (Mori, 2014), responde de manera específica a los estímulos odorantes del medio (Meister & Bonhoeffer, 2001). Este sistema, brinda a los organismos información importante para la reproducción y la supervivencia (Lledo *et al.*, 2005; León & Johnson, 2006). La capacidad del circuito olfatorio de modular sus respuestas al medio químico (Buonviso & Chaput, 2000), permite que los organismos sean capaces de discriminar estímulos similares o casi idénticos (Mandairon *et al.*, 2006b; Escanilla *et al.*, 2008).

La estimulación crónica con aromas, también conocida como enriquecimiento olfatorio (EO), es capaz de cambiar la función de los circuitos olfatorios de roedores (Mandairon *et al.*, 2006b). Por ejemplo, el EO incrementa la neurogénesis tanto en organismos jóvenes y adultos, en estructuras involucradas en el procesamiento sensorial olfatorio (Shapiro *et al.*, 2007; Bonzano *et al.*, 2014; Martončíková *et al.*, 2011), como la corteza piriforme (Shapiro *et al.*, 2007) y el bulbo olfatorio principal (BOP) (Rocheffort *et al.*, 2002; Bonzano *et al.*, 2014), lo que pudiera estar implicado en el refinamiento de ambos circuitos.

Diversos grupos de investigación se han enfocado en estudiar los mecanismos celulares involucrados en los efectos del EO sobre los circuitos olfatorios (Rocheffort *et al.*, 2002; Kerr & Belluscio, 2006; Escanilla *et al.*, 2008; Veyrac *et al.*, 2009; Martončíková *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2013). En nuestro laboratorio, se ha reportado que el EO, durante un periodo de 21 días, incrementa la potencia de la actividad eléctrica de campo en la capa granular (CG) del bulbo olfatorio principal (BOP) *in vivo* en ratones (Hernández-Soto, 2015). Además, protege al BOP contra los efectos inhibitorios producidos por la proteína beta amiloide ( $\beta$ A) (Hernández-Soto, 2015; Pimentel-Farfán, 2016). Esta proteína, forma parte de los factores implicados en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Haass & Selkoe, 2007; Peña-Ortega, 2013; Kumar, 2015).

La estimulación con aromas activa receptores ubicados en las dendritas de las neuronas sensoriales cuyo soma se ubica en el epitelio olfatorio de las cavidades nasales (Kandel, 2001). La información transducida en las neuronas sensoriales viaja a través del axón de estas células hasta llegar a la primera capa del bulbo olfatorio principal (BOP), conocida como capa glomerular, sitio donde se lleva a cabo el primer procesamiento a nivel central de la información olfatoria

(Nagayama *et al.*, 2014; Tong *et al.*, 2014). A continuación, esta información viaja a capas más profundas del BOP, donde se encuentran las células mitrales (Nagayama *et al.*, 2014). Estas células son neuronas de proyección que envían la información, previamente procesada en el BOP, hacia relevos cerebrales como la corteza piriforme, la amígdala, etc. (Tong *et al.*, 2014). La actividad coordinada de los distintos tipos celulares del BOP permite el procesamiento inicial de la información olfatoria en el sistema nervioso central (CNS) (Lledo *et al.*, 2005), por lo que cambios en la actividad del circuito bulbar, como interrupciones en la sinapsis dendrodendrítica de las células mitrales y granulares (Le Pichon *et al.*, 2009), se asocian a modificaciones en la percepción olfatoria (Le Pichon *et al.*, 2009).

En esta tesis nos proponemos evaluar la reconfiguración del circuito del bulbo olfatorio en respuesta al EO desde dos perspectivas. La primera, involucra evaluar el efecto del EO sobre el procesamiento de la información olfatoria en la capa glomerular (CGL) del BOP con imágenes ópticas de la actividad intrínseca bulbar. La segunda, incluye evaluar el efecto del EO sobre la actividad neuronal en todas las capas del BOP a través de su registro con arreglos de multielectrodos.

## 2. ANTECEDENTES

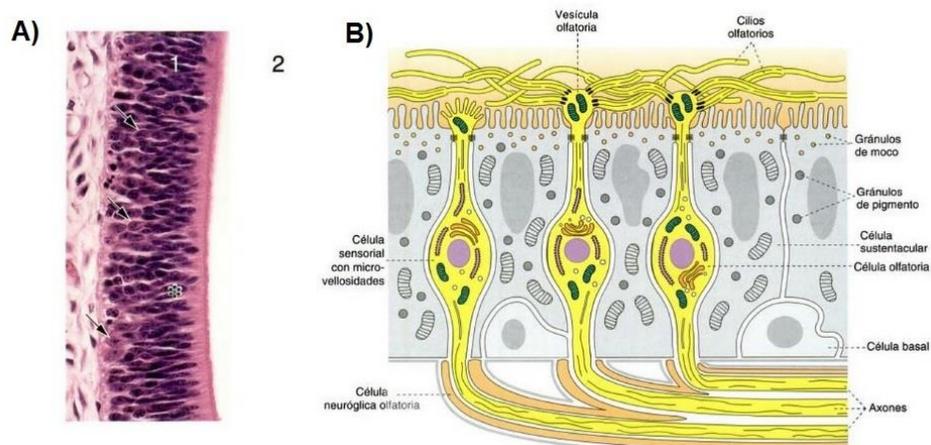
### 2.1 El sistema olfatorio

El sistema olfatorio, en muchos vertebrados, es considerado uno de los sistemas perceptuales evolutivamente más antiguos ya que no presenta relevos importantes en el tálamo (Wilson & Stevenson, 2003; Purves *et al.*, 2008; Hawkes & Doty, 2009), como el resto de los sistemas sensoriales (Purves *et al.*, 2008). El sistema olfatorio está conformado por una red neuronal compleja (Nagayama *et al.*, 2014), que permite el procesamiento de la información química del medio para la ejecución de diversos procesos que son importantes para la supervivencia animal, tales como el reconocimiento de congéneres, la búsqueda de alimento, la detección de depredadores y la reproducción (Su *et al.*, 2009; Hatt, 2004).

El primer paso para la detección olfatoria incluye la llegada de las moléculas odorantes a los receptores de superficie (acoplados a proteínas  $G_{olf}$ ) de las neuronas sensoriales olfatorias (NSO) (Crossman & Neary, 2007). Ahí, la activación de estos receptores por las moléculas odorantes produce un potencial de receptor (Reed, 1992; Hawkes & Doty, 2009) que puede inducir un potencial de acción que viaja hacia el bulbo olfatorio principal (BOP) (Reed, 1992; Hawkes & Doty, 2009), por los axones de la NSO que atraviesan la placa cribosa del hueso etmoides (Buck, 1996; Crossman & Neary, 2007). Las NSO son células bipolares que se encargan de transmitir la información olfatoria del epitelio olfatorio al BOP (Shepherd, 1972; Ojeda, 2004) y al bulbo olfatorio accesorio que es una estructura relacionada con la detección de conoespecíficos y predadores (Pardo-Bellver *et al.*, 2017).

Cada una de estas neuronas expresan exclusivamente un sólo tipo de receptor a odorante (RO) (Lowe, 2013). Aquellas NSO que expresan el mismo tipo de receptor a un odorante convergen sus axones en uno o unos cuantos glomérulos específicos (Mombaerts, 1996). En el caso de los ratones, se han reportado cerca de 1000 tipos de ROs (Lowe, 2013) y en el humano cerca de 350 ROs (Lowe, 2013). Se hipotetiza, que con esta cantidad de ROs es posible distinguir cerca de  $10^{12}$  aromas distintos (Bushdid *et al.*, 2014). Los trabajos de Buck & Axel (1991) identificaron por primera vez los genes que codifican a las proteínas receptoras olfatorias (Buck & Axel, 1991), mismas que son codificadas por un total de 1000 a 1300 genes en roedores (Zhang & Firestein,

2002; Zhang *et al.*, 2004). Dichas proteínas son capaces de dar origen a proteínas de siete dominios transmembranales que funcionan como receptores a odorantes (RO) en las NSO. Se ha demostrado que cada NSO expresa un único RO, y que cada uno de sus axones proyectan a uno o dos glomérulos por bulbo (Mombaerts *et al.*, 1996). Además de las NSO, en el epitelio olfatorio tanto de humanos como en roedores, se encuentran las células de soporte (Afifi, 1999; Suarez *et al.*, 2007) y las células basales (Afifi, 1999; Kandel, 2001; Suarez *et al.*, 2007). Las células de soporte o sustentaculares son alargadas con una base cónica que descansa sobre la membrana basal (Young *et al.*, 2006). Las células basales son células pequeñas y cónicas (Young *et al.*, 2006) que permiten el recambio de las NSO y de las células de soporte (Figura 1) (Afifi, 1999; Kandel, 2001; Young *et al.*, 2006). En el epitelio olfatorio también se encuentran las glándulas de Bowman, que se encargan de regular el medio iónico intercelular a través de la secreción de moco (Afifi, 1999; Young *et al.*, 2006; Suarez *et al.*, 2007). Las sustancias odoríferas son disueltas en el moco secretado por las glándulas de Bowman (Young *et al.*, 2006) (Figura 1).



**Figura 1. Epitelio olfatorio en humanos. A)** Corte de un epitelio olfatorio de humano de cuatro meses de edad teñido con eosina hematoxilina (señalado como 1). Las flechas señalan los núcleos de las células sensoriales olfatorias y el asterisco señala el núcleo de una célula de soporte. El número 2 indica la luz de la cavidad nasal. Magnificación a 450 x. **B)** Representación esquemática del epitelio olfatorio en la que se observan los diferentes tipos neuronales que lo componen. Modificado de Welsch, 2007.

El conocimiento acerca del BOP ha crecido enormemente en lo que respecta a su origen embrionario (Gheusi *et al.*, 2000), composición estructural (Nagayama *et al.*, 2014), organización espacial (Buonviso *et al.*, 1991), conectividad (Mombaerts, 2006), así como los diversos tipos celulares que lo conforman (Shepherd, 1972; Nagayama *et al.*, 2014). A continuación, se hará una

descripción breve de algunos de los hallazgos más relevantes con referencia a la estructura y la fisiología del BOP.

## 2.2 El bulbo olfatorio principal (BOP)

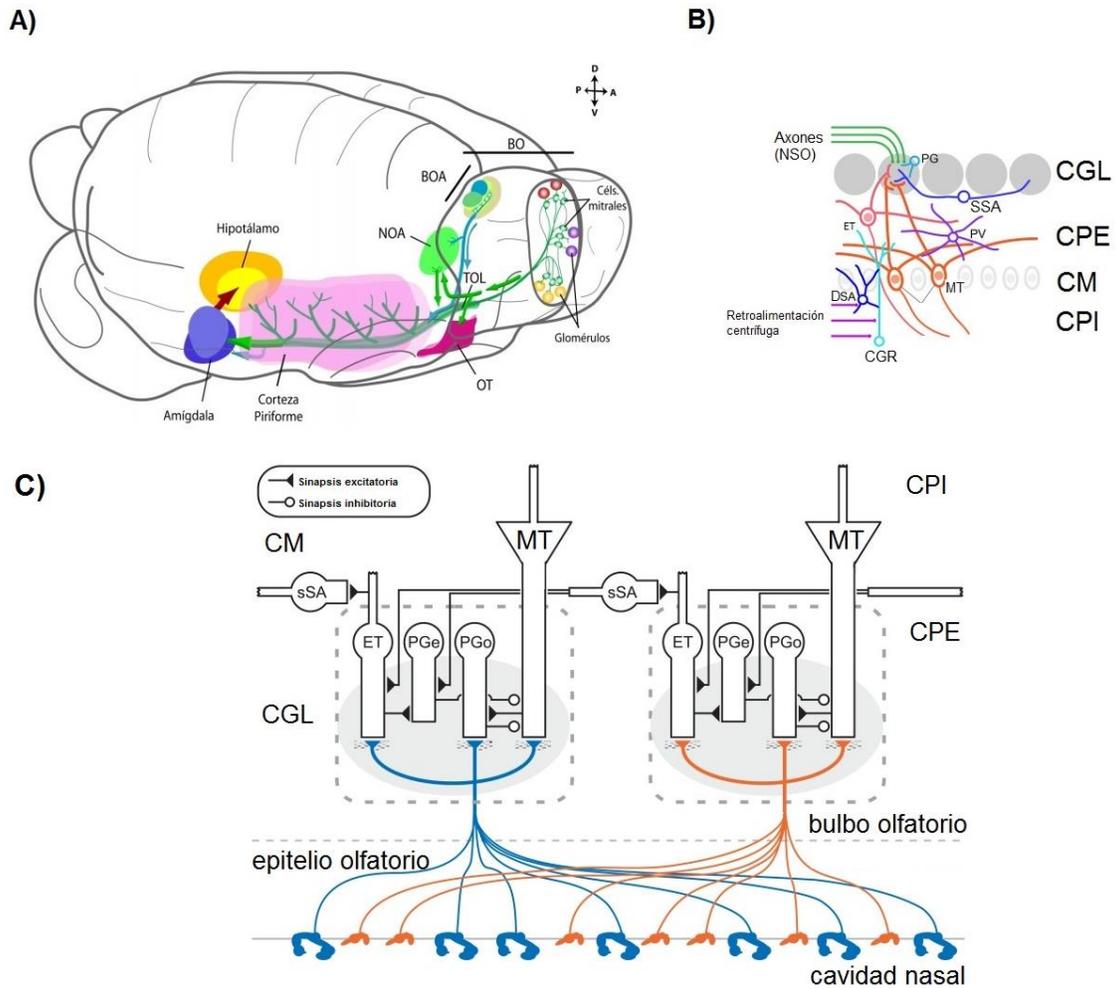
El BOP posee una organización anatómica compleja con distintos tipos neuronales que permiten la integración y el procesamiento de la información del medio químico (Haines, 2002). El BOP es una alo corteza con una organización pseudoestratificada, donde es posible localizar 6 capas (Figura 2B) (Gazzaniga *et al.*, 2004). La primera está conformada por células gliales y axones de las NSO, que constituyen al nervio olfatorio (Nagayama *et al.*, 2014), y que ingresan a la segunda capa del BOP llamada capa glomerular (CGL) (Tong *et al.*, 2014). Así mismo, los axones de las NSO establecen contactos sinápticos con las dendritas de las células mitrales (MT; cuyo soma se ubica en la capa mitral -CM-) y las dendritas de las células empenachadas (Hawkes & Doty, 2009). Estas sinapsis son glutamatérgicas y forman estructuras globulares denominadas glomérulos con un diámetro de 40-160  $\mu\text{m}$  (Royet *et al.*, 1988) (Figura 2). Los glomérulos, además, están delimitados por astrocitos (Royet *et al.*, 1988).

Entre los principales tipos neuronales descritos en la capa glomerular (CGL) se encuentran las neuronas periglomerulares (PG), que presentan proyecciones hacia un único glomérulo y, de forma ocasional, a múltiples glomérulos adyacentes así como a la CM (Parrish-Aungst *et al.*, 2007). Las PG efectúan una sinapsis de tipo inhibitoria mediadas por GABA (Nagayama *et al.*, 2014). Las PG presentan un soma pequeño (5-10 micras) y constituyen el grupo más abundante de neuronas de la CGL (Parrish Aungst *et al.*, 2007; Lowe, 2013). Las interneuronas PG incluyen células periglomerulares reguladas por los nervios olfativos (PGo), las células periglomerulares (PGe) que son excitadas a través de las células empenachadas externas (ET) (Figura 2) y múltiples subtipos de células ET de la CGL (Cleland, 2010).

Las células ET poseen un soma de 10 a 15 micras y se clasifican en dos subgrupos con base en su morfología (Macrides & Schneider, 1982; Schoenfeld *et al.*, 1985). El primer grupo de células ET corresponde a aquellas células que presentan dendritas secundarias que se ramifican hacia la capa plexiforme externa del BOP, mientras el segundo grupo de células ET no posee dendritas secundarias y su axón se ubica únicamente dentro del BOP (Macrides & Schneider, 1982;

Schoenfeld *et al.*, 1985). En la CGL también se localizan las células superficiales de axón corto (SSA; por las siglas en inglés de *superficial short-axon*) (Pinching & Powell, 1971), que poseen un soma con un diámetro aproximado de 8-12 micras y un axón que es capaz de extenderse de 1 a 2 glomérulos (Pinching & Powell, 1971).

Adyacente a la CGL, se encuentra la capa plexiforme externa (CPE) donde están las dendritas secundarias de las células mitrales y de las células granulares (Huang *et al.*, 2013). Inmediatamente, por debajo, encontramos la CM que contiene los somas de las MT, mismos que son de un diámetro aproximado de 25-35  $\mu\text{m}$  (Nagayama *et al.*, 2014). Las MT son consideradas las células de proyección principales del BOP, ya que envían sus axones hacia diferentes regiones extrabulbares incluida la corteza olfatoria (Shepherd, 1972; Tong *et al.*, 2014). A continuación de la CM encontramos a la capa plexiforme interna (CPI), que presenta primordialmente neuropilos granulares y mitrales. Por debajo de esta región se ubica la capa granular, que contiene a los somas de las células granulares (CG), de naturaleza GABAérgica y algunas de las cuales se encuentran interconectadas a través de uniones comunicantes (Friedman & Strowbridge, 2003; Christie *et al.*, 2005). Finalmente, se encuentra la capa de fibras nerviosas del tracto olfatorio (Wilson-Pauwels, 2013) (Figura 2).

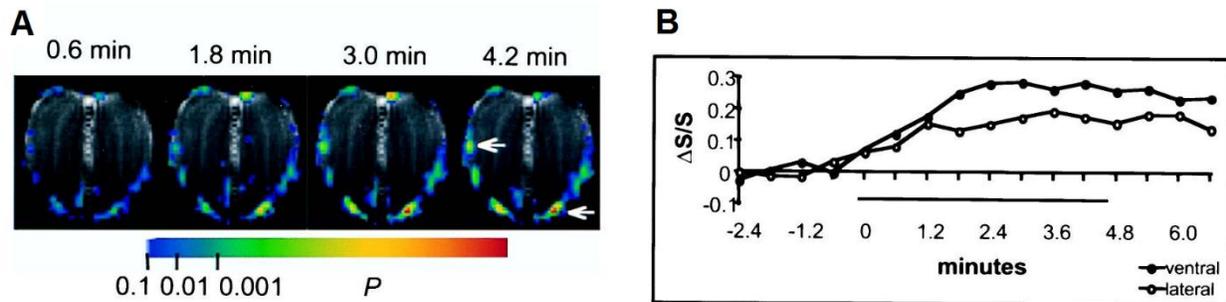


**Figura 2. Vías neuronales en el sistema olfatorio. A)** Esquema de la conectividad desde el bulbo olfatorio principal y el bulbo olfatorio accesorio (BOA) a la corteza olfatoria. Abreviaturas: BO, bulbo olfatorio; BOA, bulbo olfatorio accesorio; NOA, núcleo olfativo anterior; OT, tubérculo olfativo; TOL, tracto olfativo lateral. Tomado de Suárez *et al.*, 2007. **B)** Organización de la circuitería bulbar. Cada glomérulo recibe entradas de neuronas sensoriales olfatorias (NSO) que expresa un único tipo de receptor olfatorio. Las NSO liberan glutamato a las células empenachadas (ET), periglomerulares (PG) y de axón corto superficiales (SSA), así como a las mitrales (MT). Estas últimas transmiten la señal hacia regiones distantes del BO y son reguladas por las células granulares (CGR). Tomado de Imai, 2014. **C)** Diagrama del circuito de la capa glomerular del BO de mamífero. Además de las células ya descritas, existen interneuronas periglomerulares (PG) reguladas por el nervio olfatorio (PGo) y excitadas por células ET (PGe). Tomado de Imam *et al.*, 2012.

### 2.3 Integración de la información olfatoria.

En el BOP, los glomérulos presentan una distribución espacial específica (Adrián, 1950) que presumiblemente está relacionada con la sensibilidad a moléculas odorantes similares (Johnson & León, 2007). Se sugiere que dicha distribución espacial es segregada y con poco solapamiento entre los glomérulos (Uchida *et al.*, 2000). Estudios con imagenología óptica de la señal intrínseca permitieron caracterizar dicho patrón glomerular, confirmando que en el bulbo olfatorio dorsal existen dominios glomerulares que son activados por odorantes con grupos funcionales particulares (Uchida *et al.*, 2000).

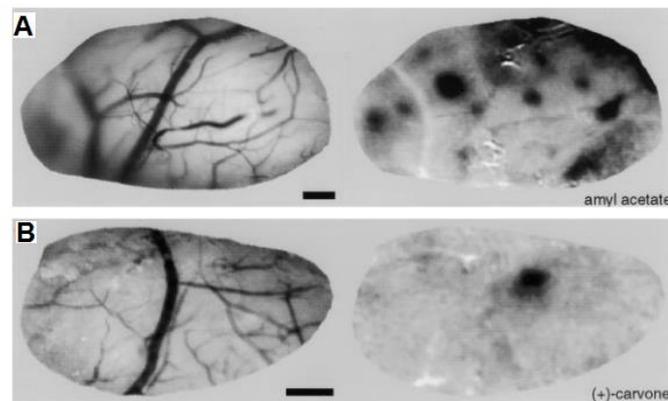
Diversas técnicas han permitido evaluar la distribución espacial y funcional de los glomérulos (Guthrie & Gall, 1995; Yan *et al.*, 1998). Tal es el caso del trabajo reportado por Yan y colaboradores (1998), quienes haciendo uso de la imagen de resonancia magnética funcional tipo *BOLD*, que se basa en el flujo sanguíneo y el nivel de oxigenación del mismo (Armony *et al.*, 2012), analizaron el patrón espacial de los glomérulos individuales activados por la estimulación con acetato de amilo, demostrando que existe una codificación espacio-temporal específica de la información olfativa a nivel bulbar (Figura 3) (Yan *et al.*, 1998).



**Figura 3. Imagen del bulbo olfatorio de la rata con resonancia magnética funcional adquirida durante la exposición continua a acetato de amilo. A)** Se muestra la señal BOLD ( $\Delta S/S$ ) en donde se observa una amplia activación de la capa glomerular y el nervio olfatorio, en ambos bulbos olfatorios durante la estimulación con acetato de amilo. **B)** Curso temporal de las regiones individuales señaladas con una flecha en **A** en la zona ventral de la capa glomerular y una segunda flecha en la capa del nervio olfatorio lateral. La línea inferior en **B** representa la duración de la estimulación olfatoria. Modificado de Yang *et al.*, 1998.

Previamente, Guthrie y Gall (1995) demostraron, mediante la inducción de genes de expresión temprana como c-Fos, que esta distribución glomerular es altamente dinámica pudiendo ser alterada durante el desarrollo postnatal, así como por cambios en la intensidad de los aromas (Guthrie & Gall, 1995). Con respecto al establecimiento de estos mapas de activación glomerular, destacan también los experimentos pioneros realizados en el laboratorio de Rubin y Katz (1999), en donde se realizó la primera imagenología de señal intrínseca del BOP. La imagenología de señal intrínseca reporta cambios en la reflectancia del tejido cerebral inducidos por la actividad neuronal (Grinvald *et al.*, 1999). La imagenología de señal intrínseca reporta cambios en la reflectancia tisular.

La reflectancia es un fenómeno físico que involucra la absorción y la dispersión de la luz del tejido cerebral (Wallace *et al.*, 2009) inducidos por la actividad neuronal (Grinvald *et al.*, 1999). Con esta técnica se pudo observar que los odorantes son capaces de activar uno o más glomérulos de manera dependiente de la concentración y que la señal inducida es simétrica entre ambos bulbos (Figura 4) (Rubin & Katz, 1999). Todos estos reportes indican que los odorantes y la concentración de estos pueden ser codificados por patrones espaciales distintivos de activación glomerular (Guthrie & Gall, 1995; Yan *et al.*, 1998; Rubin & Katz, 1999) que confieren un papel importante a la CGL en el procesamiento de la información sensorial olfatoria (Schoppa & Westbrook, 2001).



**Figura 4. Imagenología óptica de señales intrínsecas inducidas con dos odorantes.** Del lado izquierdo se muestra el patrón de vasos sanguíneos y del lado derecho el patrón de activación glomerular en el BOP de rata. **A)** Un estímulo olfatorio con acetato de amilo al 100%, generó una respuesta amplia con regiones de activación con un tamaño de 100-200  $\mu\text{m}$  que presumiblemente son glomérulos individuales. **B)** Respuesta inducida con (+)- carvona, en la que se observa una unidad claramente definida tras la estimulación. Tomado de Rubin & Katz, 1999.

## 2.4 Propiedades electrofisiológicas del BOP

Los registros electrofisiológicos de potencial de campo local han permitido caracterizar la actividad poblacional generada por diversos grupos neuronales en el BOP, así como también la especificidad de esta actividad ante diversos estímulos (Adrian, 1950; Kay 2014). De esta forma, se han descrito 3 tipos de oscilaciones principales en el BOP que se aglutinan en la banda de frecuencia delta-theta: 2-12 Hz (Kay, 2005; Martín & Ravel, 2014), la banda de frecuencia beta: 15-30 Hz (Martín & Ravel, 2014) y la banda de frecuencia gamma: 40-100 Hz (Martín & Ravel, 2014; Kay, 2015).

Los componentes de frecuencia delta-theta (2-12Hz) en el BOP (Kay, 2005; Martín & Ravel, 2014) están estrechamente relacionados con el ciclo inspiratorio-espирatorio (Kay *et al.*, 2009). Diversos reportes sugieren que esta banda de frecuencia está relacionada con la generación de ondas lentas en el hipocampo (Kay, 2005; Kay *et al.*, 2009), mismo que recibe aferencias provenientes del BOP a través de la corteza entorrinal (Mori, 2014). El acople del BOP y el hipocampo permite el procesamiento y almacenamiento de la información olfatoria (Mori, 2014; Attems *et al.*, 2015). Este acople no sólo ocurre en el rango de ondas lentas, sino además ocurren en ondas de alta frecuencia conocidas como ondas gamma (Mori, 2014).

El procesamiento de la información asociada a los aromas induce el surgimiento de ondas gamma cuyo patrón oscilatorio se ubica en el rango de 40-50 Hz (Bressler & Freeman, 1980). Trabajos pioneros realizados por Adrián (1950) mostraron por primera vez la presencia de patrones oscilatorios en el rango gamma en el BOP durante la estimulación olfatoria con odorantes (Adrian, 1950). Su caracterización fue realizada posteriormente en el BOP de gatos, conejos y ratas (Rall & Shepherd, 1968; Bressler & Freeman, 1980). Desde entonces, numerosos experimentos han surgido en relación con esta banda de frecuencia y su influencia en el procesamiento olfatorio. Por ejemplo, se ha reportado que las oscilaciones gamma del BOP inician en la transición de la inhalación a la exhalación, y su aparición correlaciona con la detección de los estímulos olfatorios (Kay & Freeman, 1998; Neville & Haberly, 2003; Ravel *et al.*, 2003). La generación y el mantenimiento de las oscilaciones gamma se debe primordialmente a las interacciones neuronales producidas por las sinapsis dendrodendríticas bidireccionales entre células mitrales/empenachadas glutamatérgicas y las células granulares GABAérgicas (Rojas-Líbano & Kay, 2008; Brea *et al.*, 2009; Kay 2015).

La actividad oscilatoria en la banda de frecuencia beta (15-30 Hz) en el BOP está asociada al reconocimiento de los aromas y a su categorización en animales despiertos (Lowry & Kay, 2007). Por ejemplo, animales expuestos a una tarea de discriminación olfatoria, exhiben una disminución en la potencia de las bandas gamma con un incremento en las bandas beta en el rango de 27 Hz durante el reconocimiento de olores (Ravel *et al.*, 2003), lo que puntualiza su participación para la diferenciación de los estímulos aromáticos (Ravel *et al.*, 2003; Lowry & Kay, 2007).

Recientemente, François y colaboradores (2015) reportaron que la regulación de las bandas de frecuencias beta y gamma, depende directamente de un equilibrio entre las entradas sensoriales al BOP y las entradas centrifúgales provenientes de la corteza piriforme (François *et al.*, 2015). A través de registros de potencial de campo local, en animales anestesiados con uretano, se demostró que la ocurrencia de cada uno de estos eventos depende, además, de la excitabilidad de las células granulares (Kay, 2014).

### 2.5 Interacciones neuronales en el BOP

Los diferentes ritmos oscilatorios del BOP son generados por las interacciones entre las propiedades intrínsecas de las neuronas bulbares, así como por las interacciones inhibitoras y excitadoras entre ellas y las provenientes de circuitos extrabulbares (Lepousez & Lledo, 2013). Las neuronas granulares, que incluyen a las células de Blane, Clandin, Golgi y las células de Hensen (Shepherd *et al.*, 2004; Nagayama *et al.*, 2014) producen GABA (Shepherd *et al.*, 2004), de la misma forma que las interneuronas glomerulares (Ojeda, 2004). Estos tipos celulares mantienen interacciones inhibitorias con las neuronas excitadoras o de proyección (mitrales y empenachadas) quienes liberan recíprocamente glutamato como principal neurotransmisor (Fukunaga *et al.*, 2014). En la capa granular del BOP ocurren la mayor cantidad de interacciones recíprocas MT/Granulares (Neville & Haberly, 2003), vía sinapsis dendro-dendríticas (Schoppa & Urban, 2003), mismas que se sugiere constituyen uno de los generadores primordiales de las oscilaciones rápidas gamma inducidas por las sustancias odoríferas del medio ambiente (Neville & Haberly, 2003).

Experimentos realizados por Neville y Haberly (2003) sugieren que la generación de los ritmos gamma bulbares surge de la interacción neuronal exclusivamente dentro del bulbo olfatorio (Neville & Haberly, 2003). Sin embargo, la generación de los ritmos beta relacionados con la discriminación fina de olores (Fourcaud-Trocme *et al.*, 2014), requieren de la participación de la

corteza piriforme para su generación (Neville & Haberly, 2003). Presumiblemente, la generación de los ritmos theta también requiere de las neuronas periglomerulares ubicadas en la capa glomerular del BOP (Fukunaga *et al.*, 2014). Estas células reciben una excitación directa mediante la liberación de glutamato proveniente de las NSO y generan un sistema de retroalimentación negativa debida a su liberación local de GABA (Cleland & Sethupathy, 2006).

## *2.6 El enriquecimiento olfatorio.*

Como se mencionó anteriormente, los odorantes son capaces de activar un patrón glomerular y bulbar complejo que puede ser monitoreado por distintas técnicas tales como la imagenología de señales intrínsecas (Chery *et al.*, 2011; Vincis *et al.*, 2012), el registro de campo eléctrico (Adrian, 1950) y las tinciones glomerulares (Mombaerts *et al.*, 1996). De los primeros experimentos realizados para evaluar dicho patrón, destacan los de Adrian (1950) quien, a través del estudio de potenciales evocados determinó, que distintos odorantes activan diferentes regiones de la capa glomerular del BOP, lo que le permitió acuñar el término “odotopia” para definir la activación de los mapas olfatorios glomerulares y la subsecuente activación de las neuronas bulbares (Adrian, 1950).

La estimulación sensorial con aromas de manera crónica es capaz de refinar los mapas olfatorios (Kerr & Belluscio, 2006). Este refinamiento se produce por la reorganización de las terminales axónicas de las NSO en la capa glomerular del BOP, lo que permite un área de activación mucho más limitada frente a estímulos olfatorios (Kerr & Belluscio, 2006).

Esta estimulación, conocida como enriquecimiento olfatorio (EO) (Martončíková *et al.*, 2011) y que supone la exposición a una gama amplia de aromas durante un periodo prolongado, mejora la memoria olfatoria a largo (Rocheffort *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2013) y a corto plazo (Veyrac *et al.*, 2009), favorece el aprendizaje y la discriminación olfatoria (Escanilla *et al.*, 2008; Abraham *et al.*, 2016) y cambia la composición celular de la red del BOP propiciando un incremento de la incorporación de células granulares (Rosselli-Austin & Williams, 1990). Adicionalmente, el EO produce una modificación de estructuras corticales involucradas en el procesamiento olfatorio, tales como la corteza piriforme, que es considerada como la primera región cortical de entrada de la información proveniente del BOP (Rocheffort *et al.*, 2002; Mandairon *et al.*, 2006; Shapiro *et al.*, 2007; Purves *et al.*, 2008).

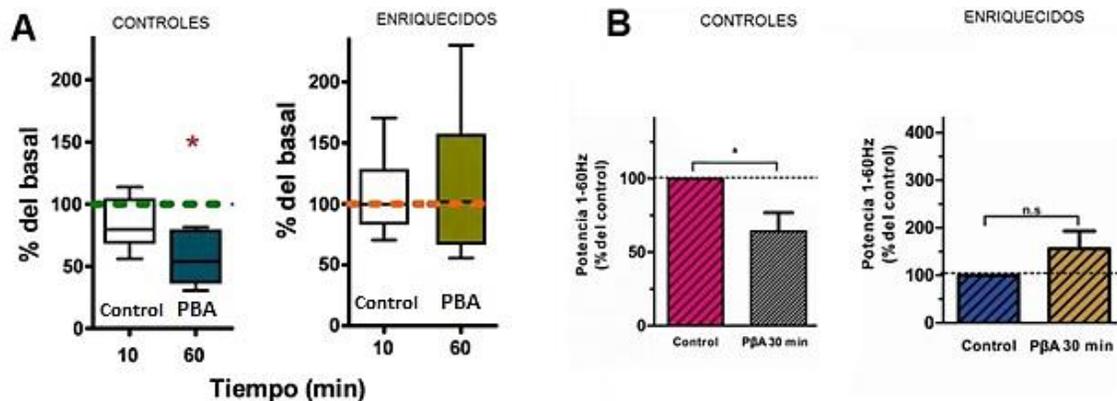
El EO se utilizó por primera vez por Hennessy y colaboradores en 1977 con la finalidad de evaluar la respuesta apetitiva en roedores. De esta forma, se concluyó que el EO modifica el patrón alimentario de los animales, quienes mostraron un incremento en la ingesta de nuevas fuentes alimenticias en respuesta al EO (Hennessy *et al.*, 1977). Más tarde, se demostró que el EO produce un incremento en la activación glomerular en el BOP ante olores conocidos (Coopersmith & León, 1986; Coopersmith *et al.*, 1986; Abraham *et al.*, 2016). Este cambio en la activación glomerular en el BOP después del EO se mantiene a largo plazo (Coopersmith & León, 1986). Actualmente, sabemos que este incremento en la activación glomerular no es generalizado al resto del BOP, pues también existe una disminución en el patrón de activación de las neuronas mitrales en el BOP tras la estimulación pasiva con aromas (Buonviso *et al.*, 1998). Con relación a este fenómeno, Johnson y colaboradores (2013) demostraron que la exposición a un sólo odorante durante un mes, disminuye significativamente el número de células mitrales en ratones carentes del canal Kv1.3, un canal de potasio dependiente de voltaje y que genera un fenotipo caracterizado por un incremento en la detección de olores (Johnson *et al.*, 2013).

Así mismo, el EO es capaz de incrementar la neurogénesis bulbar (Bovetti *et al.*, 2009; Veyrac *et al.*, 2009), potenciando al mismo tiempo la incorporación de las células nuevas a los circuitos preexistentes (Livneh *et al.*, 2014; Lazarini *et al.*, 2014), especialmente en el caso de las células granulares (CG) y periglomerulares (PG) del BOP (Rochefort *et al.*, 2002; Mandairon *et al.*, 2008; Bonzano *et al.*, 2014). El EO también promueve una disminución en la muerte celular (Wilson *et al.*, 1987; Mandairon *et al.*, 2008). Bovetti y colaboradores (2009) reportaron que el EO influye de manera similar a las CGRa y las PGs, pues es capaz de incrementar la supervivencia de las células recién nacidas que se diferencian a estos tipos neuronales. Este mismo grupo mostró que el EO incrementa de forma transitoria la expresión de la GAD67 (enzima que cataliza la descarboxilación de glutamato a GABA), así como la expresión de otras moléculas relacionadas con la plasticidad neuronal; como PSA-NCAM -una molécula de adhesión celular- y doblecortina (Bovetti *et al.*, 2009).

La incorporación de neuronas nuevas en regiones particulares del BOP (Rochefort *et al.*, 2002) acelera el refinamiento de los mapas olfatorios (Mandairon *et al.*, 2008) y propicia una mejora en la capacidad discriminatoria en los ratones ante la presencia de odorantes químicos similares (Mandairon *et al.*, 2006b; Escanilla *et al.*, 2008). En este sentido, Mandairon y

colaboradores (2006b), encontraron que después del EO, las ratas podían discriminar componentes en mezclas binarias que no habían sido discriminadas antes del período de enriquecimiento (Mandairon *et al.*, 2006b). Los efectos del EO se han relacionado también con la excitación producida en el BOP, principalmente con la activación del receptor a glutamato tipo NMDA (Mandairon *et al.*, 2006). De esta manera, Buonviso & Chaput (2000), demostraron que un periodo de seis días de exposición a aromas es suficiente para modificar la proporción de respuestas excitatorias sobre las inhibitorias de las células mitrales ante la presencia de olores (Buonviso & Chaput, 2000).

Interesantemente, el EO por un periodo de tiempo similar al empleado por Buonviso & Chaput (2000), es capaz de recuperar la memoria social a largo plazo, en roedores sometidos a aislamiento social (Gusmão *et al.*, 2011). Se conoce que dicho aislamiento es capaz de alterar el olfato y la persistencia de la memoria social en estos animales, convirtiendo así al EO en una vía para mejorar el reconocimiento entre congéneres (Gusmão *et al.*, 2011). Coincidentemente, en condiciones patológicas como aquellas que simulan a la enfermedad de Alzheimer (EA), el EO es capaz de disminuir la fosforilación de la proteína Tau, que es una proteína importante para la estabilidad de los microtúbulos neuronales, en estructuras como el hipocampo y la corteza cerebral en mamíferos (Liao *et al.*, 2012). Así mismo, datos de nuestro laboratorio indican que el EO es capaz de proteger al BOP contra los efectos inhibitorios de la proteína  $\beta$ A tanto *in vivo* como *in vitro* (Figura 5) (Hernández-Soto, 2015; Pimentel-Farfán, 2016).



**Figura 5. Efecto protector del enriquecimiento olfatorio (EO) sobre la actividad eléctrica de la capa granular del BOP en presencia de la proteína  $\beta$ A.** Se muestran cuantificaciones de la potencia normalizada (basal o control = 100 %) de la actividad eléctrica poblacional del BOP. Note que el EO evita la inhibición de la actividad espontánea de las neuronas granulares del BOP inducida por la proteína  $\beta$ A *in vitro* (**A**) e *in vivo* (**B**). Nótese que tras la aplicación de la proteína  $\beta$ A la potencia de la CG no se ve reducida en ambos casos cuando los animales se sometieron a EO. **A**) Tomado de Pimentel-Farfán, 2016; **B**) Tomado de Hernández-Soto, 2015).

Adicionalmente, se reportó que el EO mejora la detección de aromas atractivos (Hernández-Soto, 2015) como el cacahuete y aversivos innatos, como el 2,4,5-trimetiltiazol, una molécula de la orina del zorro (Pimentel-Farfán, 2016). En humanos, una variante del EO conocido como entrenamiento olfatorio; que supone la exposición activa dos veces al día a cuatro olores durante 12 semanas (Haehner *et al.*, 2013), ha producido una mejora significativa en la función olfativa en pacientes con enfermedad de Parkinson (Haehner *et al.*, 2013).

Pese a la basta información aquí planteada, los mecanismos involucrados en la reconfiguración del circuito bulbar tras un periodo de EO, siguen sin esclarecerse. Así mismo, es necesario señalar que algunos de los experimentos aquí citados han incluido el análisis restringido de ciertas regiones del BOP (Coopersmith & León, 1986; Coopersmith *et al.*, 1986; Rosselli-Austin & Williams, 1990; Kerr & Belluscio, 2006; Martončíková *et al.*, 2011; Abraham *et al.*, 2016). Por lo anterior, que en este proyecto nos proponemos evaluar la reconfiguración del circuito bulbar en respuesta al EO desde la entrada sensorial a nivel de los glomérulos, hasta la actividad global de los componentes del circuito del BOP en todas sus capas.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema olfatorio, y en particular el bulbo olfatorio, es un sistema complejo que es capaz de reorganizarse ante las presiones y estímulos del medio (Adam *et al.*, 2014). Diversos reportes han señalado que el EO es capaz de cambiar la fisiología del BOP en los distintos niveles de procesamiento de la información olfatoria (Coopersmith & León, 1986; Coopersmith *et al.*, 1986; Rosselli-Austin & Williams, 1990; Kerr & Belluscio, 2006; Martončíková *et al.*, 2011; Abraham *et al.*, 2016). Resultados recientes en nuestro laboratorio indican que el enriquecimiento olfatorio es capaz de modular las oscilaciones de la CG del BOP. Así mismo, el EO pudiera tener efectos terapéuticos en ciertas patologías como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson. Por lo anterior, consideramos importante caracterizar el proceso fisiológico plástico que ocurre en respuesta a la exposición pasiva y prolongada a aromas dentro de un protocolo de EO. De la misma manera, consideramos relevante evaluar este fenómeno desde niveles primarios del procesamiento de la información olfatoria (la entrada de información en la capa glomerular del BOP), hasta la salida de información de esta estructura a través de la actividad de las células MT y ET; incluyendo en la evaluación otras capas del BOP involucradas en el procesamiento interno de la información. Con base en ello, en esta tesis nos propusimos caracterizar la activación glomerular y la dinámica de la actividad neuronal del circuito del BOP tras la estimulación crónica con odorantes.

#### **4. HIPOTESIS**

El EO modifica los patrones de activación glomerular y la actividad de las neuronas del circuito del BOP.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar los cambios en la actividad del circuito del BOP en ratones expuestos a EO.

#### **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Analizar los cambios de los patrones de activación glomerular de los ratones enriquecidos olfatoriamente.
- Analizar los cambios de la actividad del potencial de campo local en ratones sometidos al protocolo de enriquecimiento olfatorio.
- Evaluar el efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la actividad neuronal del BOP.
- Evaluar los cambios en la discriminación y percepción olfatorias de ratones enriquecidos olfatoriamente.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Animales.

Se emplearon ratones macho de la cepa CD-1 de 8 semanas de edad (35-40g), obtenidos del Bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla. Los animales fueron mantenidos en un ciclo normal de 12 horas luz/oscuridad, a una temperatura constante de  $22 \pm 1$  °C, con agua y alimentación *ad libitum*. Los experimentos se realizaron acorde a las regulaciones del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología UNAM Campus Juriquilla siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Uso de animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO 1999).

### 7.2 Enriquecimiento olfatorio.

El protocolo de EO utilizado en esta tesis está basado en el trabajo de Martončíková y colaboradores (2011) y está sustentado en datos de nuestro laboratorio que indican que esta modalidad de EO es capaz de inducir una modificación de la actividad eléctrica de la CG del BOP (Hernández-Soto, 2015). El EO consiste en la exposición pasiva a 21 odorantes sintéticos y naturales (aceite de almendras dulces, acetato de amilo, albahaca, anís estrella, citrol, clavo de hojas, eucalipto, heptaldehído, hierbabuena, hojas de canela, lavanda, limón, mandarina, menta piperita, octilaldehído, pino, romero español, salvia española, tomillo, toronja blanca y wintergreen -Droguería Cosmopolita S.A DE C.V-), uno por día, durante 21 días.

Cada uno de los odorantes fue presentado dos veces durante una hora con una diferencia mínima entre cada exposición de 3 horas, por la mañana y por la tarde (Martončíková *et al.*, 2011). Se aplicaron 5  $\mu$ l de cada odorante en un hisopo colocado dentro de un frasco de plástico con la tapa perforada, mismo que se situó en la caja habitación del animal. La caja estaba ubicada en un sistema de ventilación independiente, lo que evitó la salida de los aromas al bioterio. En el caso de los animales control, se adicionaron 5  $\mu$ l de agua en el hisopo dentro del frasco de plástico y la exposición fue exactamente la misma que para los sujetos experimentales.

### *7.3 Craneotomía en el BOP para la imagenología de señal intrínseca.*

Al finalizar el protocolo de EO, se evaluó el patrón de activación de la capa glomerular del BOP durante la estimulación con odorantes, mediante la técnica de imagen de señal intrínseca (Grinvald *et al.*, 1999). Para ello, los animales fueron anestesiados con Uretano (2g/Kg de peso corporal, vía intraperitoneal). Antes de cualquier incisión, se generó anestesia local con lidocaína 30 mg/kg vía subcutánea. Se aplicaron lágrimas artificiales para prevenir la resequedad en los ojos (Artelac Rebalance). Posteriormente, los animales fueron montados en un aparato estereotáxico para mantener la cabeza fija del animal y evitar el movimiento durante la toma de la imagen. La temperatura corporal fue monitoreada y mantenida a 30° C usando una almohadilla térmica (Beurer-Living). Se hizo una incisión en la piel, a la altura de uno de los BOPs (seleccionado aleatoriamente), y se retiró la misma para exponer el cráneo, mismo sobre el que se perforó una ventana desde la línea media con 2.5 mm de ancho y ubicada 4 mm anterior a Bregma. Se dejó la dura intacta y, posteriormente, la craneotomía fue cubierta con líquido cefalorraquídeo artificial, que contenía (en mM): 119 NaCl, 30 glucosa, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 3 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub> y 1.5 CaCl<sub>2</sub> y pH (7.4) a temperatura ambiente. Finalmente, la craneotomía se selló con un cubreobjetos para la obtención de imágenes y el resto del cráneo fue cubierto con acrílico dental.

### *7.4 Imágenes de señal intrínseca en el BOP.*

Para la obtención de la imagen intrínseca bulbar los animales permanecieron montados en el aparato estereotáxico y fueron situados bajo sistema de toma de imágenes intrínsecas (Imager 3001F System Optical Imaging). Cada uno de los animales fue implantado con dos electrodos de plata (Grass Instrument Co.) en los músculos intercostales y un electrodo de plata como referencia en la cola, con estos electrodos se obtuvo un electrocardiograma que fue digitalizado con ayuda del software Clampex 10.6.2 (Axon Molecular Devices) y que permitió al software de captura Vdaq (Vdaq 3001F) sustraer el movimiento provocado por el latido cardiaco en el BOP al momento de la toma de la imagen.

Para visualizar el patrón de los vasos sanguíneos superficiales, el BOP fue iluminado con luz verde (530 nm) al inicio y al final de cada ensayo experimental. Estas imágenes de referencia fueron tomadas para alinear las imágenes subsecuentes. Para la obtención del patrón de activación glomerular, el BOP dorsal fue iluminado con luz roja (630 nm). Las imágenes fueron adquiridas a 50 Hz (exposición de 20 ms/imagen) con una resolución de 1pixel/50 $\mu$ m<sup>2</sup> en un área de 2 x 1 mm sobre la superficie bulbar. Lo anterior, durante 8 segundos: 4 segundos antes y 4 segundos durante el estímulo con acetato de amilo 99% (Sigma Aldrich) y esencia de canela al 99% (Droguería Cosmopolita).

La estimulación con odorantes fue efectuada utilizando un olfactómetro construido en el laboratorio. Este consistió en una serie de mangueras y válvulas que permitieron el paso selectivo de un flujo de aire por un tubo de plástico provisto con acetato de amilo al 99%. Se suministró aire limpio, filtrado y regulado por un flujómetro durante todo el experimento, con lo que nos aseguramos de disipar el aroma de las narinas del animal después de cada estimulación odorífera. Los tubos fueron situados por delante de las narinas del animal donde se emitió un pulso de aire con odorante durante 4 segundos. El procedimiento mencionado anteriormente fue realizado con ayuda de un Picospritzer (PicoPump, World Precision Instruments), sincronizado con el software para la adquisición de imágenes (Vdaq 3001F) con la finalidad de tener un mejor control temporal de la aplicación de odorante y, adicionalmente, minimizar el estrés del animal. Cada aroma fue presentado con una diferencia de 10 minutos entre cada estimulación hasta completar como mínimo 10 estimulaciones por aroma.

Para el análisis, las imágenes de los vasos sanguíneos fueron alineadas para comparar el patrón de vasos sanguíneos con ayuda de los softwares WinMix (Optical Imaging) e ImageJ 1.5 (National Institutes of Health USA). Para las ilustraciones, las imágenes representan el promedio de todos los cuadros adquiridos durante la estimulación (4 segundos) menos los cuadros adquiridos durante la fase pre-estímulo (4 segundos).

### *7.5 Registros con multielectrodos en animales anestesiados.*

Al finalizar el protocolo de EO se realizó el registro de la actividad de campo local con un arreglo de multielectrodos, con el fin de evaluar los cambios inducidos por el EO sobre la actividad eléctrica de las diferentes capas del BOP. El día del registro, los animales fueron anestesiados con uretano (2g/Kg de peso corporal, vía intraperitoneal). La anestesia fue comprobada mediante la ausencia de respuesta motora a estímulos dolorosos. Posteriormente, se removió la piel y, con ayuda de un taladro dental, se realizó un trepano sobre el cráneo con las siguientes coordenadas estereotáxicas, basadas en el atlas de Franklin & Paxinos (2007): anterior a Bregma 4.78 y medio-lateral 1.65. Finalmente, con ayuda de una aguja 26G se retiró la dura. Adicionalmente, se colocaron 2 tornillos de referencia y tierra justo por debajo de Bregma teniendo especial cuidado de no tocar el cerebro. Lo anterior, con la finalidad de reducir al máximo el ruido en la señal electrofisiológica.

Los registros fueron realizados usando sondas de silicón de 16 canales (NeuroNexusTech; A1x16-5mm-25-177) con un diámetro del electrodo de 15  $\mu\text{m}$  y con una separación de 50  $\mu\text{m}$  entre cada uno de los electrodos. La sonda penetró al tejido en un ángulo de 90° desde la superficie dorsal hasta la zona medial del BOP con una coordenada dorso-ventral de 0.65 (Franklin & Paxinos, 2007). Con esta posición de la sonda, se alcanzó la capa granular del BOP con los electrodos más ventrales. Los registros fueron adquiridos a 40 kHz y las señales obtenidas fueron transferidas a una computadora para su análisis fuera de línea con los softwares Offline Sorter y NeuroExplorer 5.0.

Para evaluar la actividad eléctrica inducida con aromas, los animales fueron estimulados con acetato de amilo 99% (Sigma-Aldrich) y con esencia de canela (Droguería Cosmopolita S.A DE C.V) con ayuda de un hisopo que contenía 5 $\mu\text{l}$  de odorante. Dicho hisopo fue colocado directamente frente a las narinas por 10 segundos con un tiempo inter-estímulo de 10 minutos).

### *7.6 Prueba de alimento enterrado.*

Al finalizar el protocolo de enriquecimiento olfatorio se efectuó la prueba olfatoria de alimento enterrado (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013). Para ello, los animales fueron alojados en una caja con aserrín limpio. Después de 30 minutos de habituación al entorno de prueba se colocó, en una de las esquinas de la caja (asignadas aleatoriamente en cada ensayo) y 1 cm por debajo de la superficie del aserrín, 25mg de un trozo de galleta (TRIKI-TRAKES ®). Se contabilizó el tiempo que les toma a los animales encontrar el trozo de alimento. El tiempo máximo para la prueba fue de 600 s. Para los análisis estadísticos se cuantificó la latencia para encontrar el alimento, para ambos grupos (controles y EO).

### *7.7 Prueba de Habitación-deshabitación olfatoria.*

Con la finalidad de evaluar la capacidad de detección y discriminación de aromas en los animales sometidos al protocolo de EO, utilizamos la prueba de habituación-deshabitación, con algunas modificaciones (Zou *et al.*, 2015). La prueba consiste en la exposición secuencial a un aroma neutro (agua destilada: 2 ensayos), seguidos de la exposición repetida a esencia de vainilla (1 % V/V: 3 ensayos) y, finalmente, a vinagre (1% V/V: 3 ensayos). Cada una de las exposiciones se realizó durante 3 minutos con un periodo entre exposiciones de 1 minuto. Cada uno de los aromas (5 µL) fueron colocados en un papel filtro de 2 x 2 cm situado en un recipiente metálico circular (4.5 cm de circunferencia) en la jaula del animal. Todas las pruebas fueron realizadas después de 30 minutos de habituación al entorno de prueba: caja de acrílico de 27 x 17 x 12 cm, con aserrín limpio. Para el análisis de la prueba se cuantificó el tiempo de exploración del sitio donde se encuentra el odorante. Para esta prueba la habituación se considera como la disminución en el tiempo de la exploración a través de los ensayos y la deshabitación como un incremento de la exploración ante un aroma novedoso (Wesson *et al.*, 2010).

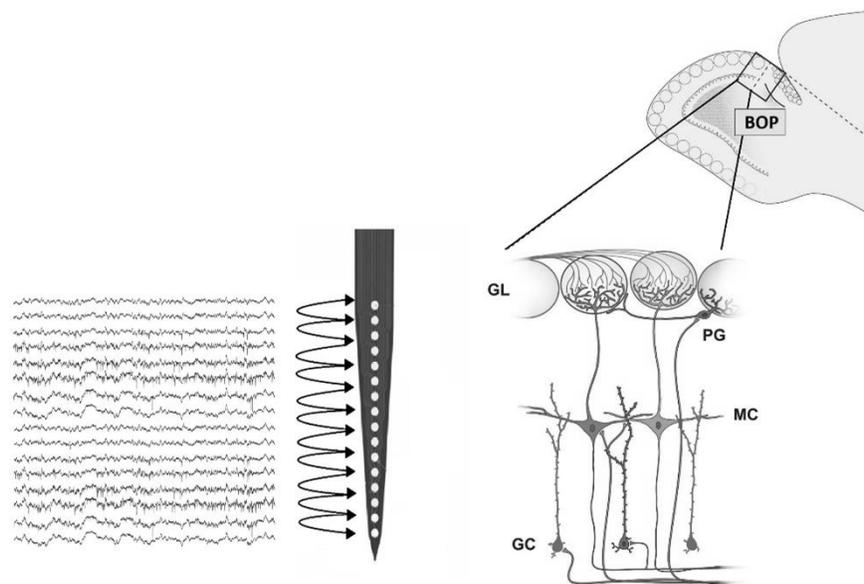
### 7.8 Análisis de datos y análisis estadístico.

Para analizar los registros poblacionales del BOP *in vivo*, se realizó un análisis del potencial de campo local (LFP, por sus siglas en inglés) de la condición espontánea, así como durante la actividad inducida por aromas en animales enriquecidos y controles. Para su análisis, se utilizaron ventanas de 5 minutos para la condición espontánea y 10 segundos para la actividad inducida con aromas. Los registros fueron seleccionados y exportados utilizando el programa NeuroExplorer (v 5.0). Se calculó la potencia espectral del LFP de cada uno de los 16 electrodos mediante la Transformada Rápida de Fourier, con una ventana de Hamming en la banda de 1-200 Hz para cada condición, con una resolución espectral de 0.05 Hz. Dichos registros se analizaron con una rutina personalizada de Matlab (versión R2015b). Los valores numéricos de la potencia espectral obtenidos en la condición inducida con aromas se normalizaron con respecto de la actividad basal en el ancho de banda de 1-200 Hz. Se sumó el total de los valores de la potencia espectral para las bandas delta 1-4, theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz), gamma (30-80Hz) y gamma rápido (80-200 Hz) (Buszáki & Watson, 2012; Zhou *et al.*, 2017). Estos valores fueron divididos entre la sumatoria de los valores de la potencia espectral del ancho de banda (1-200Hz). Con ello fue posible calcular la potencia relativa para cada condición experimental. Para la comparación del efecto del EO en el LFP obtenido de cada uno de los electrodos de registro, utilizamos estadística no paramétrica. Dado que nuestros resultados no pasaron las pruebas de normalidad, realizamos el análisis de las diferencias entre los grupos mediante una U de Mann Whitney. Se consideró una  $p < 0.05$  como diferente significativamente. Las gráficas de la potencia en las distintas bandas de frecuencia se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media.

Adicionalmente, se analizó la coherencia para la totalidad de las capas del bulbo olfatorio con los registros de LFP obtenidos con el registro con multielectrodos. Para ello, se utilizó una rutina de Matlab personalizada con ayuda de la función *mscohere*, con la cual fue posible realizar la comparación de las coherencias entre pares de electrodos (Figura 6). Otra rutina de Matlab nos permitió generar matrices de las coherencias obtenidas en el análisis. Finalmente, las coherencias obtenidas fueron separadas por bandas de frecuencia en los rangos mencionados en el párrafo anterior. Con la finalidad de evaluar la presencia de diferencias significativas entre la coherencia

obtenida entre pares de electrodos situados en las capas del BOP realizamos una prueba de U de Mann Whitney. Lo anterior, debido a que los resultados no pasaron las pruebas de normalidad.

Evaluamos la totalidad de la coherencia de la red bulbar mediante un histograma de la distribución de las coherencias obtenidas para todas las condiciones (actividad espontánea, e inducida con canela y acetato de amilo 99%). Las diferencias entre los datos representados en dichos histogramas fueron evaluadas con una prueba de U de Mann Whitney. Lo anterior, debido a que los datos no presentaron una distribución normal. Para todos los casos, se consideró una  $p < 0.05$  como diferente significativamente.



**Figura 6. Análisis de la coherencia de la actividad intrabulbar.** El análisis de la coherencia del LFP se realizó entre cada uno de los 16 electrodos situados en el BOP. Se muestra un ejemplo del arreglo de multielectrodos en el BOP (esquema a la izquierda) con su respectivo LFP. Cada coherencia fue comparada con respecto de las coherencias restantes (Modificado de Araneda, 2017). Del lado derecho se muestra un esquema del BOP, para ejemplificar las capas en las que se llevaron a cabo los registros con la izquierda. GL: Capa glomerular; PG: Células periglomerulares; MC: Capa mitral; GC: capa granular.

Para el análisis de las espigas extracelulares, la señal muestreada a 40 kHz fue filtrada de 350-7500 Hz para la identificación de espigas extracelulares provenientes de actividades únicas y/o multiunitarias, mediante el uso del software OfflineSorter (Versión 4.2.0 Plexon Neurotechnology Research Systems USA; Nieto-Posadas *et al.*, 2014). Para ello, los registros obtenidos de la actividad espontánea (10 minutos) y la inducida con aromas (1 minuto- ya sea con acetato de amilo al 99% o esencia de canela 99%-), fueron unidos con ayuda del software PlexUtil (v.4.0.1; Plexon Inc., USA). Las espigas fueron detectadas por un clasificador, fuera de línea, estableciendo un umbral de  $>2.6$  la desviación estándar de la señal (Supér & Roelfsema, 2005). Las unidades individuales (SUAS, por sus siglas en inglés) se distinguieron del ruido biológico y eléctrico a través de los análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) de las formas de onda de las espigas detectadas (Supér & Roelfsema, 2005). Lo anterior, con un enfoque semiautomático utilizando el algoritmo de clasificación “estándar de máxima-expectancia” de OfflineSorter. Cuando las espigas no pudieron ser clasificadas como una neurona única, se les consideró como actividad multiunitaria (MUA, por sus siglas en inglés; Supér & Roelfsema, 2005), para lo cual establecimos un umbral de  $>4.0$  la desviación estándar de la señal. Las espigas que se ubican dentro del periodo refractario (2 ms) de las unidades o multiunidades seleccionadas fueron descartadas. La clasificación fue verificada por la existencia del periodo refractario en el histograma del intervalo inter-espiga, así como con ayuda de una auto-correlación. Las series temporales que incluyen a las MUAS y SUAS fueron exportadas a Matlab (versión R2015b) para la construcción de los *raster plots* mediante una rutina elaborada para evaluar la tasa de disparo neuronal (Pérez Ortega, 2017).

Los *raster plots* fueron convertidos a unidades binarias con una resolución de 1ms. Para evaluar la ocurrencia de eventos cuasi-simultáneos entre pares de unidades (MUAS y/o SUAS) se realizó un análisis de correlación cruzada (Nieto-Posadas *et al.*, 2014), con ventanas de retraso de  $\pm 5$  ms. Las correlaciones se consideraron significativas cuando el pico de la correlación-cruzada alcanzó valores  $> 2.6$  desviaciones estándar del ruido del correlograma.

Las matrices de correlación con el análisis de correlación cruzada, fueron elaboradas para cada condición experimental: actividad espontánea e inducida por aromas. La matriz de correlación es una matriz cuadrada de  $n \times n$  construida a partir de los valores de correlación obtenidos del análisis de la correlación cruzada. Finalmente, con ayuda de estas matrices se cuantificó el número

de conexiones para los nodos (unidades) identificados en cada experimento. Además, se realizaron las siguientes cuantificaciones basadas en la teoría de grafos: a) longitud característica, que se cuantificó con ayuda de la función *charpath* de Matlab, que permite cuantificar el promedio de las longitudes entre pares de nodos en la red. b) coeficiente de agrupamiento, que se cuantificó con ayuda de la función *clustering\_coef\_wu* de Matlab y que permite cuantificar el promedio de la intensidad (media geométrica) de todos los triángulos asociados con cada nodo (Onela *et al.*, 2005). c) Eficiencia, que se cuantificó con ayuda de la función *charpath* de Matlab y que permite calcular el promedio inverso de las longitudes más cortas en la red. Lo anterior, permite conocer la topología de la red bulbar en los animales enriquecidos olfatoriamente en comparación con los animales control. Todos estos índices fueron calculados con ayuda de una rutina de análisis personalizados en Matlab elaborada en el laboratorio y con ayuda de las herramientas del *brain-connectivity-toolbox.net* (Rubinov *et al.*, 2010). Para evaluar las diferencias en todas las cuantificaciones obtenidas basadas en la teoría de grafos, realizamos una prueba de U de Mann Whitney. Los datos se reportan como diferentes significativamente con una  $p < 0.05$ . Para las tablas se reporta la media  $\pm$  el error estándar de los datos.

Para las imágenes de señal intrínseca bulbar, la respuesta a odorantes fue revelada restando la señal con estímulo (durante 4 segundos) menos su línea base (correspondiente a los primeros 4 segundos de registro). Los mapas de odorantes presentados corresponden al promedio de la respuesta obtenida durante los 4 segundos de estimulación. Para el análisis de las imágenes de señal intrínseca, las imágenes fueron promediadas para cada condición (con estímulo y sin estímulo). En estas imágenes se realizó el conteo automático de los glomérulos activos, así como la superficie ocupada por dichos glomérulos expresada en  $\mu\text{m}^2$  (Figura 7). Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ 1.51k, siguiendo la metodología descrita previamente por Grishagin (2015), con algunas modificaciones. Cada imagen promedio con formato RGB fue transformada a un formato de 8 bits (escala de grises de 0 a 255) y posteriormente se estableció un umbral de detección de los pixeles cercanos al 0 (negro) del 10%. Posteriormente con ayuda del Toolbox de ImageJ “*Analyze Particles*” se realizó el conteo de los glomérulos activos y se estimó el área de cada uno de ellos. Adicionalmente, se evaluó la dinámica de activación glomerular a lo largo de los 4 segundos de estimulación. Finalmente se evaluó la posición de los glomérulos en la superficie dorsal del bulbo olfatorio (Blanco-Hernández *et al.*, 2012). Para ello se establecieron las posiciones de los centroides glomerulares en el eje X y, con lo cual se calculó la distancia Euclidean promedio

entre todos los glomérulos contabilizados mediante una rutina personalizada en Matlab con ayuda de la función *pdist*.

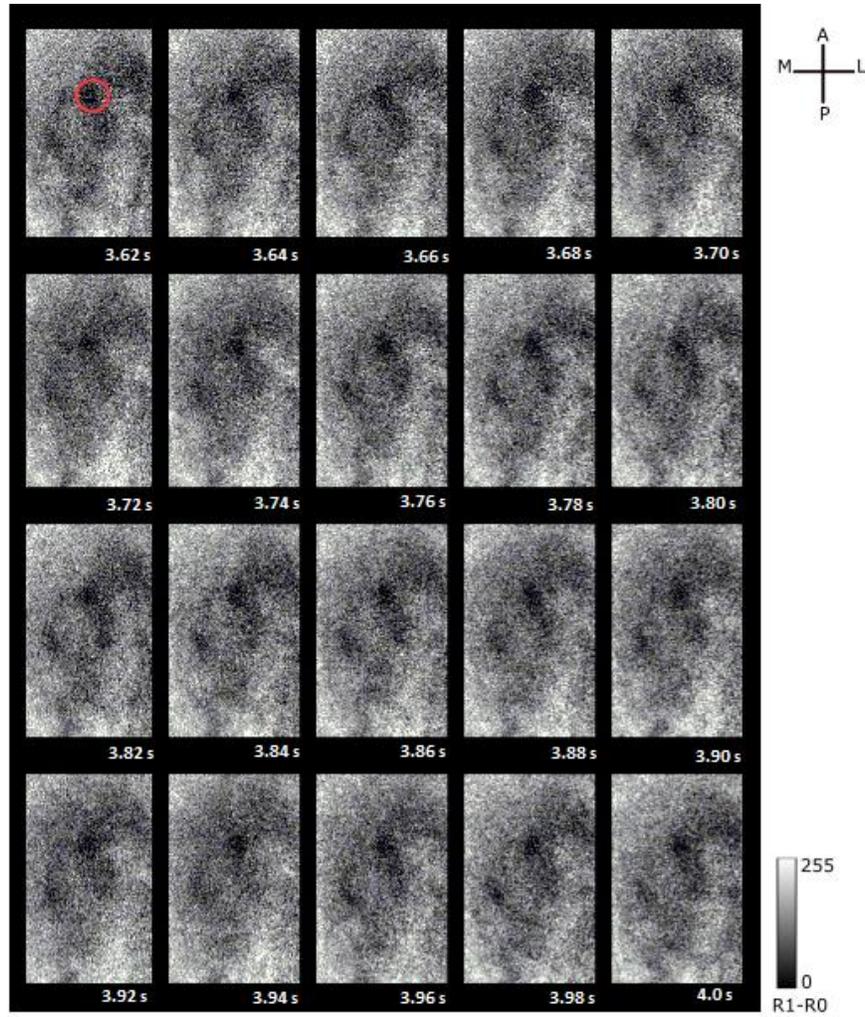
La distancia Euclideana fue calculada como sigue:

$$d_E(P_1, P_2) = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$$

Donde P1 y P2 corresponden a los centroides de los glomérulos, X1-Y1 son las coordenadas del glomérulo 1 y X2-Y2 las coordenadas del glomérulo 2. Posteriormente se calculó la distancia promedio entre todos los glomérulos detectados.

Se presentan los resultados ambos grupos (control y enriquecidos) tras la estimulación con esencia de canela y acetato de amilo al 99%. Para la selección automatizada de las regiones de interés (glomérulos) y para la selección de la gran región de interés (BOP-dorsal) se utilizaron los softwares WinMix e Image J. Para la comparación del conteo glomerular y los datos de la superficie total, se utilizó estadística no paramétrica (U de Mann Whitney), dado que los resultados no pasaron las pruebas de normalidad. En todos los casos, el valor de  $p < 0.05$  se consideró como diferente significativamente. Los datos se presentan en graficas de caja de Tukey, donde se representa en la línea central la mediana, la caja representa los percentiles 95 y 5%, así como las líneas verticales que finalizan en una línea horizontal representan observaciones máximas y mínimas.

Las pruebas conductuales y el peso de los animales, fueron analizadas con estadística no paramétrica (U de Mann Whitney). En todos los casos el valor de  $p < 0.05$  se consideró como diferente significativamente. Los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de la media. Los histogramas presentados en esta tesis relacionados con la actividad eléctrica de los registros de campo y el análisis estadístico de dichos análisis, así como los gráficos mostrados en el análisis de imagen y los cálculos estadísticos para las pruebas conductuales se realizaron con el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA).



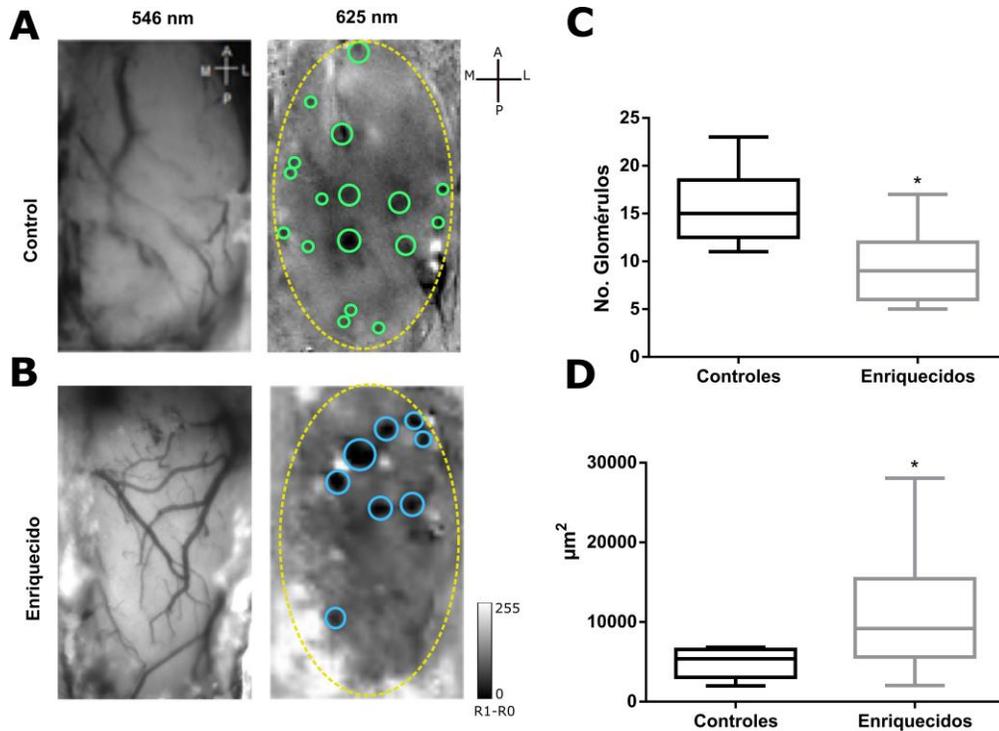
**Figura 7. Imagen óptica intrínseca bulbar.** Imágenes representativas capturadas en la superficie dorsal del BOP en el último segundo de la estimulación con acetato de amilo al 99% de un ratón CD-1 de 11 semanas de edad y sometido a enriquecimiento olfatorio. El círculo en rojo de la primera imagen indica un glomérulo como ejemplo de los que se contabilizaron para el análisis. Note que el glomérulo permanece activo durante todo el tiempo que el estímulo odorante estuvo presente.

## 8. RESULTADOS

### *8.1 Efecto del EO sobre el patrón de activación de la capa glomerular del BOP inducida por aromas.*

Con el fin de evaluar el patrón de activación glomerular de los ratones expuestos a un protocolo de EO, se realizó imagenología de la señal intrínseca del bulbo olfatorio dorsal mientras se expuso a los animales a diferentes aromas (Figura 7). Durante la exposición a acetato de amilo al 99% se observa la presencia de regiones de activación con forma y tamaño similar a los glomérulos identificados por Rubin y Katz (1999) con la técnica de imagenología óptica (Rubin & Katz., 1999).

Los ratones sometidos al protocolo de EO exhibieron un mapa de activación glomerular que difiere con respecto de los animales control (Figura 8 A-B). Se observa una disminución en el número y un incremento en el área de los glomérulos activos en los animales enriquecidos con aromas comparados con el control (Figura 8 A-B). Al analizar las secuencias de imágenes (Figura 7) para contabilizar el número de glomérulos activos durante la estimulación, encontramos que los animales enriquecidos con aromas muestran un promedio de glomérulos activados en respuesta a acetato de amilo al 99% de  $9.571 \pm 1.52$ , lo que es significativamente menor con respecto de los glomérulos activados en los animales control, donde se encontraron  $15.67 \pm 1.70$  glomérulos activados en respuesta a acetato de amilo al 99% ( $p < 0.05$ ,  $n=6$  animales para ambos grupos; Figura 8-C). Además, la cuantificación del área ( $\mu\text{m}^2$ ) de los glomérulos contabilizados evidencia un incremento en el tamaño glomerular en los animales enriquecidos olfatoriamente comparados con el control ( $p < 0.05$ ,  $n=6$  para ambos grupos, Figura 8-D). En promedio, el área por glomérulos activos en respuesta a la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99% es de  $11379 \pm 3217 \mu\text{m}^2$  en los animales enriquecidos, mientras que el área ocupada por glomérulo activado en respuesta a acetato de amilo 99% es de  $4922 \pm 782.70 \mu\text{m}^2$  en los animales control ( $p < 0.05$ ,  $n=6$  para ambos grupos, Figura 8-D).

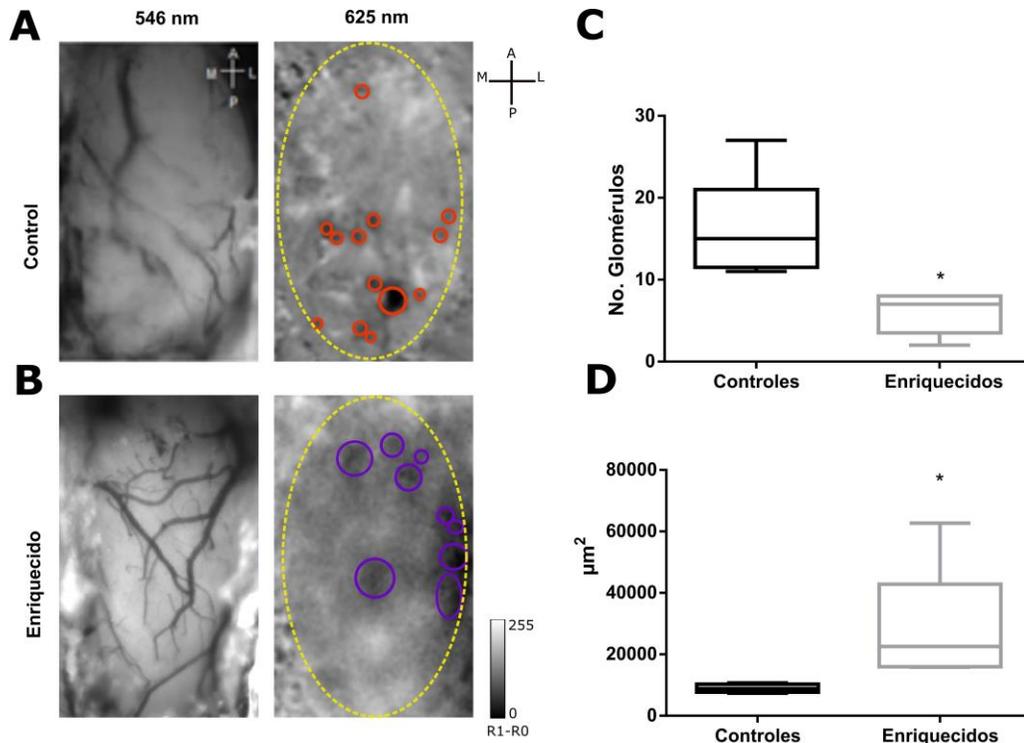


**Figura 8. Patrón de activación glomerular de la superficie dorsal del BOP tras la estimulación con acetato de amilo al 99% en animales control y animales enriquecidos olfatoriamente.** Las fotografías del lado izquierdo en A y B, muestran el patrón de vasos sanguíneos del BOP (visualizados con un filtro de 546 nm). Mientras que las del lado derecho muestran la señal intrínseca bulbar inducida con acetato de amilo al 99% (visualizadas con un filtro de 625nm) en un ratón CD-1 control (**A**) y en un ratón enriquecido olfatoriamente (**B**). Los círculos indican los glomérulos contabilizados. Note la reducción en el número de los sitios de activación glomerular, así como un incremento en el tamaño glomerular en el animal enriquecido olfatoriamente. **C**) Número de glomérulos activados por la estimulación con acetato de amilo al 99% en ambos grupos. Note que los animales enriquecidos presentan un menor número de glomérulos activados con respecto del control (n=6 en ambos grupos, p<0.05). **D**) Se grafica el área glomerular expresada en  $\mu\text{m}^2$  en animales control o enriquecidos olfatoriamente. Note un incremento significativo en el tamaño por glomérulo en los animales enriquecidos comparados con el control (n=6 en ambos grupos, p<0.05). Los valores son representados en cajas de Tukey, donde se representa en la línea central la mediana, la caja representa los percentiles 95 y 5%, así como las líneas verticales que finalizan en una línea horizontal representan observaciones máximas y mínimas.\* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control (p<0.05).

Además del acetato de amilo, los animales fueron estimulados con esencia de canela, un aroma que no se incluyó en el protocolo de EO y que, además, es considerado un aroma compuesto por diversas moléculas aromáticas, como el cinamaldehído, el eugenol, entre otros (Singh *et al.*, 2007; Rao & Gan, 2014; De March *et al.*, 2015). La estimulación con esencia de canela nos permite averiguar si la modificación de la activación glomerular observada ante un aroma conocido se generaliza a aromas novedosos. De manera similar a la estimulación con acetato de amilo, los animales enriquecidos exhibieron un mapa de activación glomerular que difiere con respecto de los animales control. Se observa una disminución en el número y un incremento en el área de los glomérulos activos tras la estimulación con esencia de canela en los animales enriquecidos con aromas en comparación con los animales control (Figura 9 A-B).

Al realizar el análisis de la secuencia de las imágenes (Figura 6) para contabilizar el número de glomérulos activos durante la estimulación con esencia de canela, encontramos que los animales enriquecidos con aromas muestran un promedio de glomérulos activados en respuesta a esencia de canela de  $6 \pm 1.03$ , lo que es significativamente menor con respecto de los glomérulos activados en los animales control, donde se encontraron  $16 \pm 2.86$  glomérulos activados en respuesta a esencia de canela ( $p < 0.05$ ,  $n=6$  para ambos grupos, Figura 9-C).

La cuantificación del área promedio de los glomérulos de los animales enriquecidos con aromas es de  $29308 \pm 7392 \mu\text{m}^2$  lo que es significativamente más grande en comparación con los animales control quienes presentan un área promedio de  $8945 \pm 606.40 \mu\text{m}^2$  ( $p < 0.05$ ,  $n=6$  para ambos grupos, Figura 9-D).

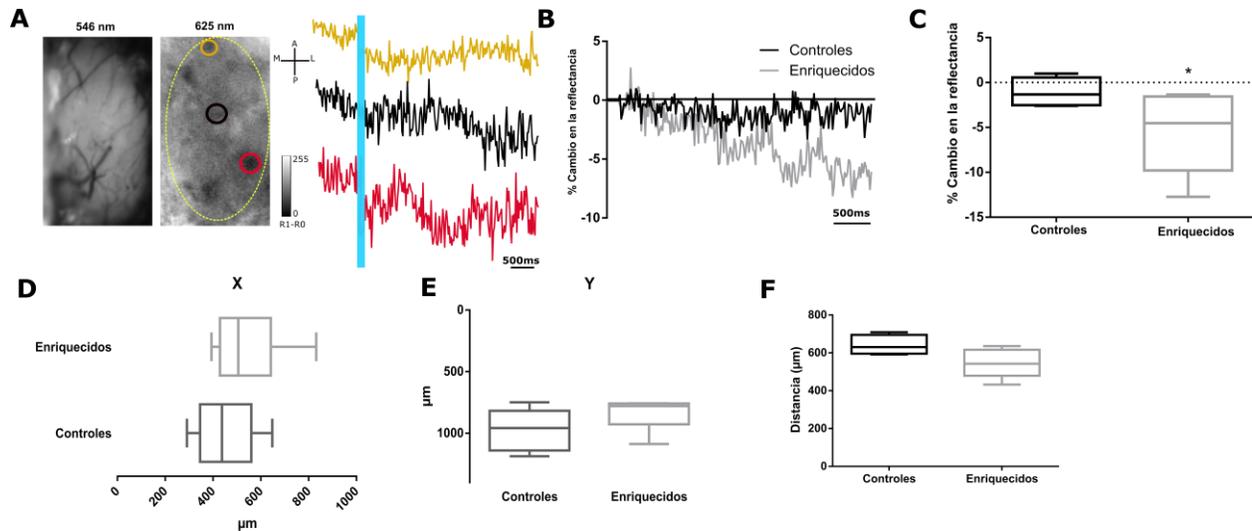


**Figura 9. Patrón de activación glomerular de la superficie dorsal del BOP tras la estimulación con esencia de canela en animales control y animales enriquecidos olfatoriamente.** Las fotografías en A y B (izquierda) muestran el patrón de vasos sanguíneos del BOP (visualizados con un filtro de 546 nm). Mientras que las del lado derecho muestran la señal intrínseca bulbar inducida con esencia de canela (visualizadas con un filtro de 625 nm) en un ratón CD-1 control **(A)** y en un ratón enriquecido olfatoriamente **(B)**. Los círculos indican los glomérulos contabilizados. Note la reducción en el número de sitios de activación glomerular, así como un incremento en el tamaño glomerular en el animal enriquecido olfatoriamente. **C)** Se grafica el número de glomérulos activados por la estimulación con esencia de canela en ambos grupos. Note que los animales enriquecidos muestran un menor número de glomérulos activados con respecto del control ( $n=6$  en ambos grupos;  $p<0.05$ ). **D)** Se grafica el área glomerular expresada en  $\mu\text{m}^2$  en animales normales o enriquecidos olfatoriamente. Note un incremento significativo en el tamaño por glomérulo en los animales enriquecidos comparados con el control ( $n=6$  en ambos grupos,  $p<0.05$ ). Los valores son representados en cajas de Tukey, donde se representa en la línea central la mediana, la caja representa los percentiles 95 y 5%, así como las líneas verticales que finalizan en una línea horizontal representan observaciones máximas y mínimas.\* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p<0.05$ ).

Al analizar la dinámica de activación glomerular en los animales control y enriquecidos con aromas, encontramos que la cinética glomerular inducida con esencia de canela es muy variable durante el periodo de estimulación, incluso entre animales del mismo grupo (Figura 10-A). Por

ello, con la finalidad de evaluar los cambios en la dinámica glomerular global durante la estimulación con esencia de canela de los animales controles y enriquecidos con aromas, se analizó la dinámica temporal promedio de la absorbancia de todos los glomérulos activados durante los 4 segundos de la estimulación olfatoria (Figura 10-B). Una normalización con respecto de la actividad espontánea, considerada como el 100% para el análisis, indica que los animales enriquecidos con aromas muestran una menor reflectancia en el último segundo de la estimulación olfatoria con esencia de canela con respecto de los animales control (Figura 10 B y C). El porcentaje de cambio de la absorbancia global glomerular con respecto de la actividad espontánea en los animales enriquecidos con aromas es de  $5.59 \pm 1.81\%$ , lo que es significativamente mayor en comparación con los animales control quienes exhiben un cambio de la absorbancia de  $1.50 \pm 0.70\%$  con respecto de la condición espontánea ( $p < 0.05$ ,  $n=6$  para ambos grupos, Figura 10 B y C).

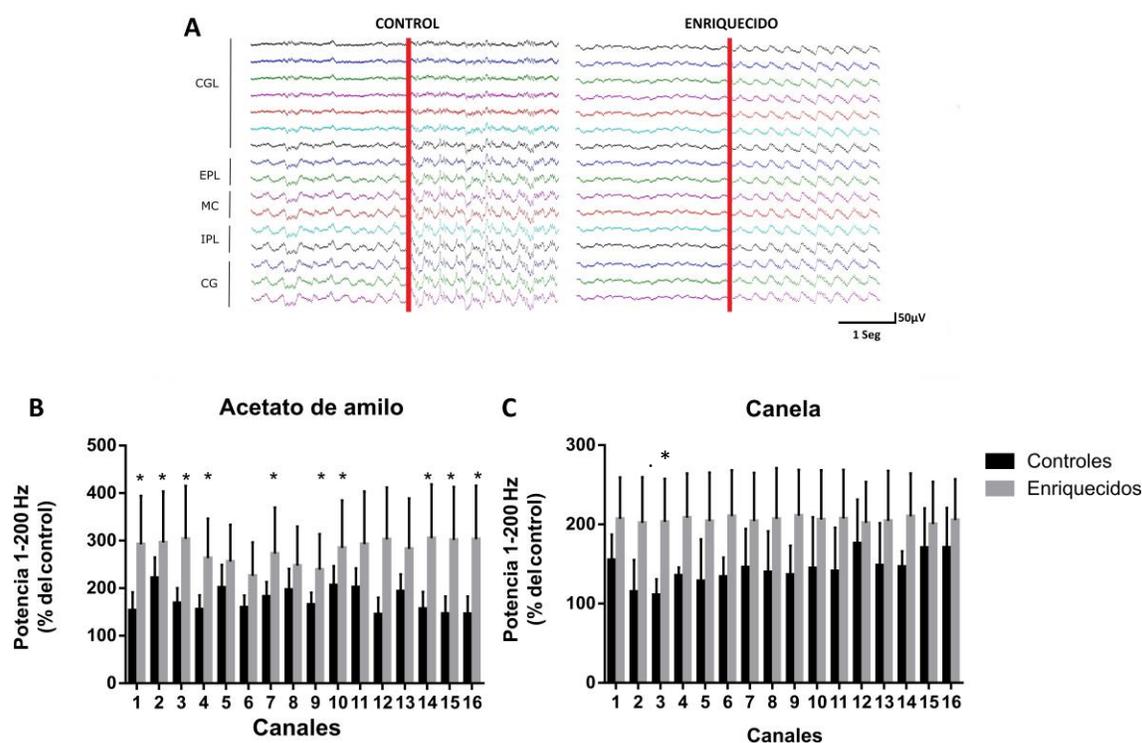
Con la finalidad de describir con mayor precisión la localización de los glomérulos bulbares después del protocolo de enriquecimiento olfatorio realizamos un análisis de la dispersión glomerular. La evaluación de la posición de todos los glomérulos contabilizados tras la estimulación olfatoria con esencia de canela no reporta diferencias significativas entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ,  $n=6$  para ambos grupos, Figura 10 D-E). Las distancias encontradas en el plano cartesiano constituido por la superficie dorsal del BOP indican que los glomérulos activados tras la estimulación con esencia de canela de los animales enriquecidos con aromas están localizados en las siguientes coordenadas: X (media-lateral):  $542.80 \pm 63.88 \mu\text{m}$  y Y (anterior-posterior):  $838.70 \pm 52.70 \mu\text{m}$ , lo que no difiere estadísticamente con respecto de los animales control, cuyos glomérulos están localizados en las coordenadas X (media-lateral):  $449.80 \pm 58.15 \mu\text{m}$  y Y (anterior-posterior):  $974.00 \pm 76.68 \mu\text{m}$  ( $p > 0.05$ ,  $n=6$  para ambos grupos; Figura 10 D-E). La dispersión de los glomérulos evaluada mediante el análisis de la distancia Euclidiana no indica diferencias significativas entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ,  $n=6$  para ambos grupos; Figura 10 F).



**Figura 10. Dinámica de la activación glomerular y posición de los glomérulos durante la estimulación con esencia de canela en animales control y animales enriquecidos olfatoriamente.** **A)** La fotografía del lado izquierdo muestra el patrón de vasos sanguíneos del BOP en un animal EO (visualizados con un filtro de 546 nm). La fotografía del lado derecho muestra la señal intrínseca bulbar inducida con esencia de canela (visualizadas con un filtro de 625 nm). Los círculos muestran 3 glomérulos representativos y, a la derecha, su dinámica de activación durante los 4 segundos de la estimulación con esencia de canela (la barra azul indica el inicio del estímulo olfatorio). **B)** Se grafica el porcentaje de cambio promedio en el tiempo de todos los glomérulos activados durante la estimulación con esencia de canela para ambos grupos con respecto de la actividad espontánea considerada como el 100%. Se observa una reducción inicial de aproximadamente el 5% para ambos grupos. Note una reducción mayor en los últimos segundos en los animales enriquecidos comparados con los animales control. **C)** Se grafica la disminución de la reflectancia en todos los glomérulos identificados en ambos grupos experimentales durante el último segundo de estimulación con esencia de canela. Los valores se muestran en cajas de Tukey donde se representa en la línea central la mediana, los percentiles 75 y 25%, así como las observaciones máximas y mínimas encontradas. **D-E)** Se grafica la posición de los glomérulos en los ejes medio-lateral (X) y antero-posterior (Y), para todos los glomérulos identificados en cada grupo experimental. Note que la posición de los glomérulos no difiere entre grupos. **F)** Se grafican las distancias Euclidianas de los glomérulos identificados en cada grupo experimental. No se observan diferencias significativas entre a los grupos (n=6 en ambos grupos;  $p > 0.05$ ). \* denota una diferencia significativa con respecto del grupo control ( $p < 0.05$ ).

## 8.2 Evaluación del efecto del EO sobre la actividad poblacional en las distintas capas del BOP.

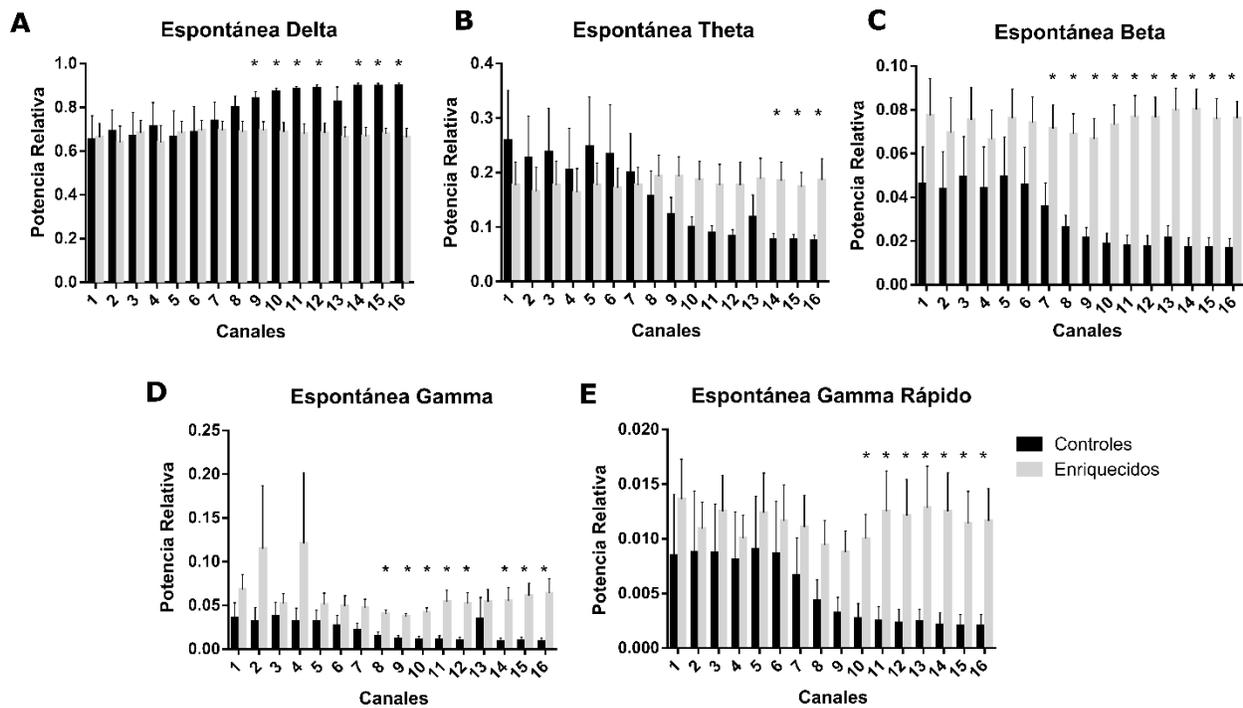
Con la finalidad de evaluar los cambios en la red bulbar después del protocolo de enriquecimiento olfatorio, se realizaron registros del LFP *in vivo* con un arreglo de multielectrodos. La actividad poblacional del BOP se caracteriza por una mezcla de patrones oscilatorios de distintas frecuencias dominado por actividad lenta en el rango theta que se entremezcla con actividad rápida beta-gamma (Figura 11-A). La estimulación olfatoria con acetato de amilo induce un incremento significativo de la potencia en casi todas las capas del BOP en animales control y EO (Figura 11 A-B;  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ). Cuando la potencia es normalizada con respecto de la actividad basal, el incremento proporcional de la potencia en presencia de acetato de amilo en los animales sometidos a EO es significativamente mayor al incremento en los animales control (Figura 11-A y B;  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ). La estimulación olfatoria con esencia de canela induce un incremento de la potencia en todas las capas del BOP con respecto de sus valores basales en ambos grupos experimentales (Figura 11-A y C;  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ). El incremento proporcional de la potencia, en presencia de esencia de canela no mostró diferencias significativas entre los grupos, excepto para un canal ubicado en la capa más superficial del bulbo olfatorio (Figura 11-C; canal número 3;  $p < 0.05$ ;  $n = 6$ ). El resto de los canales no muestran diferencias significativas en la potencia en presencia de esencia de canela en los animales sometidos a EO (Figura 11-C;  $p > 0.05$ ,  $n = 6$  para ambos grupos).



**Figura 11. Modificaciones en el potencial local de campo producidos por el EO. (A)** Trazo representativo de la actividad espontánea intrabulbar y su respuesta a la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99% en un animal control (izquierda) y EO (derecha). La barra en rojo indica el inicio de la estimulación. Note un incremento en la amplitud de las oscilaciones bulbares tras la estimulación con acetato de amilo al 99% en ambos grupos. **B)** Potencia normalizada de la actividad espontánea intrabulbar durante la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99%. Note un mayor incremento de la potencia normalizada con respecto del control en los animales EO en relación con los animales control, para casi la totalidad de los electrodos de registro. **C)** Potencia normalizada de la actividad espontánea intrabulbar durante la estimulación olfatoria con esencia de canela. No se observan diferencias significativas entre grupos, excepto para el electrodo 3 localizado en la capa glomerular del BOP (n=6 en ambos grupos). Los valores son representados como la media  $\pm$  EEM. \* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

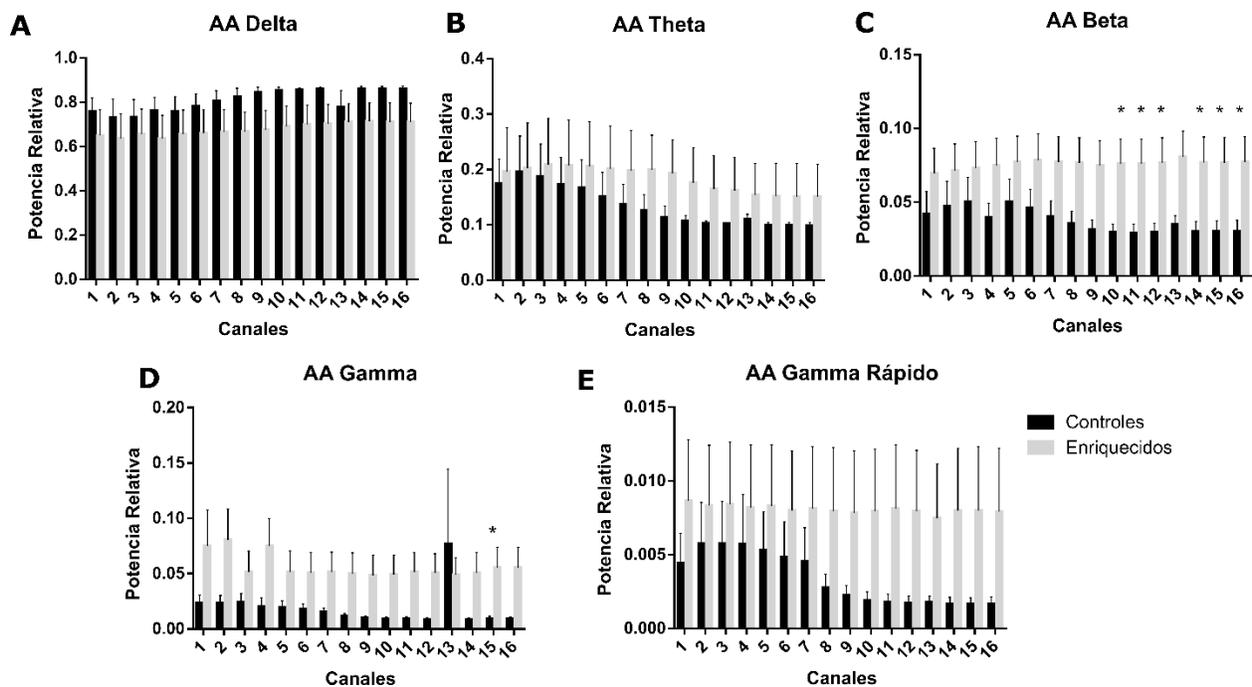
Con la finalidad de evaluar los cambios producidos en la actividad eléctrica bulbar de los animales enriquecidos con aromas analizamos la potencia relativa (PR) en diferentes bandas de frecuencia (delta 1-4 Hz, theta 4-10 Hz, beta 10-30 Hz, gamma 30-80 y gamma rápido 80-200 Hz). El análisis de la PR de la actividad espontánea de los animales enriquecidos con aromas indica una disminución significativa de la PR con respecto de los animales control en la banda de frecuencia delta (1-4 Hz) de los canales ubicados en las capas plexiforme externa, mitral, plexiforme interna

y granular ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$  en ambos grupos, Figura 12-A). La PR en la banda de frecuencia theta (4-10 Hz) de la actividad espontánea indica un incremento significativo de la potencia en los canales situados en la capa granular del bulbo olfatorio en los animales EO con respecto al control ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$  en ambos grupos, Figura 12-B). El incremento en la PR en los animales EO apenas descrito para la banda theta, se observa también en las bandas de frecuencia beta (10-30Hz), gamma (30-80 Hz) y gamma rápido (80-200 Hz), con variaciones pequeñas respecto a los canales que la muestran ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$  en ambos grupos, Figura 12).



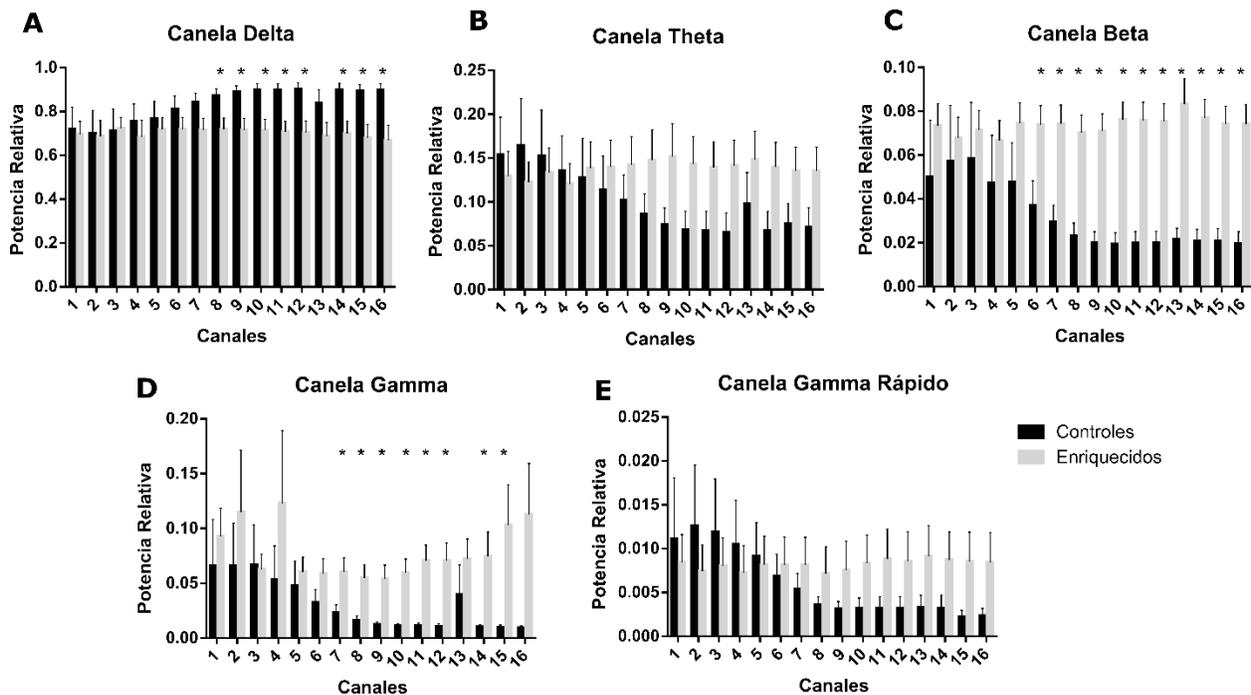
**Figura 12. Modificaciones en la potencia relativa (PR) de la actividad espontánea de animales EO y controles en las distintas bandas de frecuencia.** Note una disminución significativa de la potencia relativa delta (A) en los animales enriquecidos con aromas comparados con el control en los electrodos más profundos. Por el contrario, hay un aumento significativo en los electrodos más profundos en las frecuencias theta (B), beta (C), gamma (D) y gamma rápido (E) ( $n = 6$ , en ambos grupos). Los valores son representados como la media  $\pm$  EEM. \* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

El análisis de la PR de la actividad inducida con acetato de amilo al 99% no reporta diferencias significativas entre los grupos experimentales para la totalidad de los canales en las bandas de frecuencias delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), y gamma rápido (80-200 Hz) ( $p > 0.05$ ,  $n = 6$  en ambos grupos, Figura 13 A-B y E). Se reportan un incremento significativo de la PR en la banda de frecuencia beta (30-80 Hz) en los animales enriquecidos con aromas comparado con los animales control en los electrodos situados en la profundidad de las capas del bulbo olfatorio ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$  en ambos grupos, Figura 13-C). Adicionalmente, los animales enriquecidos con aromas exhibieron un incremento de la PR en la banda de frecuencia gamma (30-80 Hz) en uno de los electrodos situados en la capa granular del BOP ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$  en ambos grupos, Figura 13-D).



**Figura 13. Modificaciones en la potencia relativa (PR) de la actividad inducida tras la estimulación con acetato de amilo al 99% de animales EO y controles en las distintas bandas de frecuencia.** Note un incremento de la potencia relativa beta (C) y gamma (D) en los animales enriquecidos con aromas comparados con el control en los electrodos más profundos ( $n = 6$ , en ambos grupos). Los valores son representados como la media  $\pm$  EEM. \* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

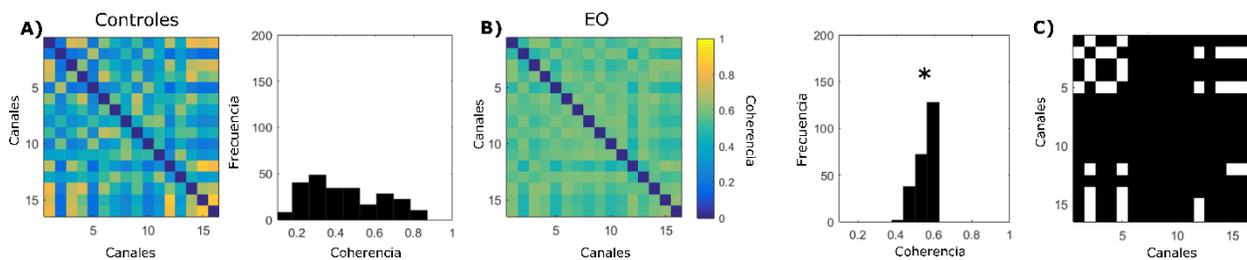
El análisis de la PR de la actividad inducida con esencia de canela de los animales enriquecidos con aromas muestra un incremento en las frecuencias delta (1-4 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-80 Hz) en los electrodos situados en la profundidad del bulbo olfatorio, presumiblemente ubicados en la capa plexiforme externa, mitral, plexiforme interna y granular; en comparación con los animales control ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$  para ambos grupos, Figura 14 A, C-D). No se reportan diferencias significativas para las bandas de frecuencia theta (4-10 Hz) y gamma rápido (80-200 Hz) ( $p > 0.05$ ,  $n = 6$  para ambos grupos, Figura 14 B-E).



**Figura 14. Modificaciones en la potencia relativa (PR) de la actividad inducida tras la estimulación con esencia de canela en animales EO y controles en las distintas bandas de frecuencia.** Note una disminución significativa de la potencia relativa delta (A) en los animales enriquecidos con aromas comparados con el control, en los electrodos más profundos. Por el contrario, hay un incremento significativo de la potencia relativa beta (C) y gamma (D) en los animales enriquecidos con aromas comparados con el control en los electrodos más profundos ( $n = 6$ , en ambos grupos). Los valores son representados como la media  $\pm$  EEM. \* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

Con la finalidad de evaluar los cambios en las interacciones entre las distintas capas del BOP inducidos por el EO, evaluamos la actividad sincronizada intrabulbar mediante un análisis de coherencia del LFP de cada uno de los electrodos situados en el BOP con respecto a los demás. Los resultados del análisis de la coherencia de la actividad espontánea bulbar muestran un incremento significativo en la coherencia en todas las bandas de frecuencia en animales enriquecidos olfatoriamente con respecto a los animales control (n=6;  $p < 0.05$ , U Mann Whitney Anexos: Figura 26 A-C). Las bandas delta (1-4 Hz), theta (4-10Hz), beta (10-30 Hz) y Gamma lento (30-80 Hz), muestran un incremento en la coherencia con respecto del control que es significativo para electrodos situados en la profundidad del BOP, correspondientes a la capa granular (n=6,  $p < 0.05$ , U Mann Whitney, Anexos: Figura 26 C).

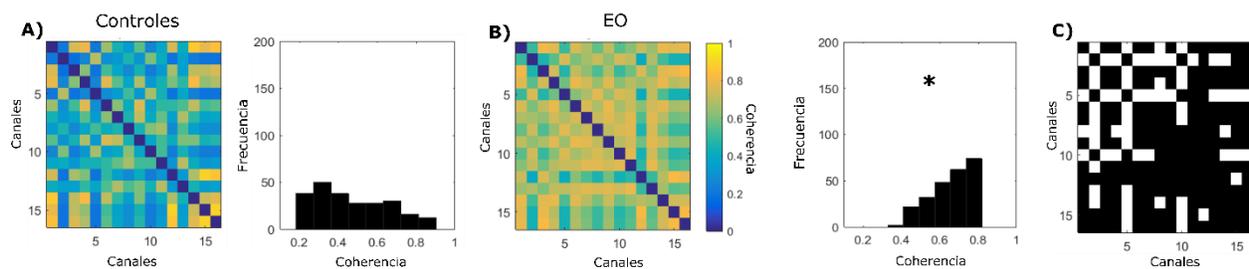
De manera relevante, se observó una disminución significativa de la coherencia en la banda de frecuencia gamma rápido (80-200 Hz) en los animales enriquecidos olfatoriamente en comparación con el control (n=6;  $p < 0.05$ , U Mann Whitney, Figura 15 A-B). Esta disminución es significativa en las capas más superficiales y profundas del BOP correspondientes a la capa glomerular y granular, respectivamente (Figura 15-C).



**Figura 15. Efecto del EO sobre la coherencia intrabulbar de las oscilaciones espontáneas poblacionales en la frecuencia gamma rápido (80-200 Hz) en animales control (A) y EO (B).** Se muestran matrices de coherencia (en escala de color) entre todos los electrodos localizados en el BOP. Note un decremento en la coherencia global en los animales EO. En (C) se muestra una matriz de significancia de las coherencias comparadas entre los dos grupos experimentales (U de Mann Whitney). Las celdas en blanco indican que un valor de  $p < 0.05$ , realizando la comparación entre la matriz de los animales controles vs EO. Se muestran histogramas de frecuencia de los valores de coherencia de todo el circuito bulbar. Los valores fueron obtenidos de la matriz de coherencia a la izquierda para cada caso. Note una reducción de los valores de coherencia de los animales EO. \* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

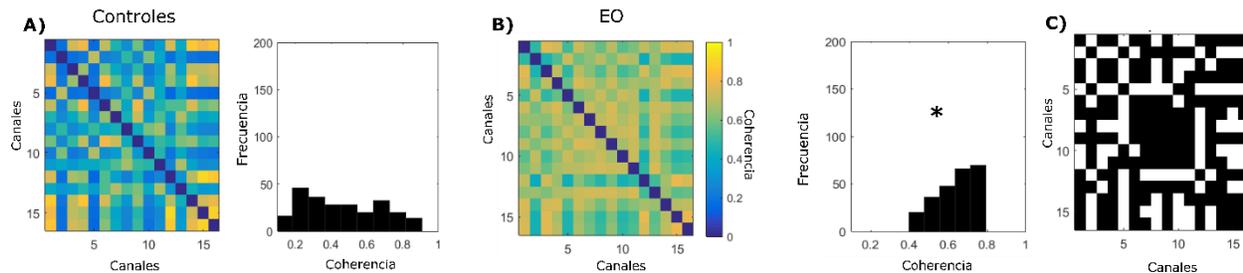
La coherencia bulbar inducida por la estimulación con acetato de amilo 99% a partir del potencial local de campo, mostró un incremento en la coherencia para casi la totalidad de las frecuencias en animales enriquecidos olfatoriamente en comparación con los animales control (n=6; p<0.05, U Mann Whitney; Anexo: Figura 27 A-B, histogramas). La coherencia en la banda delta (1-4 Hz), theta (4-10Hz), beta (10-30 Hz), muestra un incremento significativo en la coherencia con respecto del control, específicamente para electrodos situados en la superficie y la profundidad del BOP, correspondiente a la capa glomerular y granular del BOP (n=6; p<0.05, U Mann Whitney, Anexo: Figura 27-C). En relación a la coherencia en la banda de frecuencia gamma (30-80 Hz), se observa un incremento significativo en los animales EO con respecto del control, específicamente en la superficie y en la profundidad del bulbo olfatorio. Se reporta un incremento significativo de la coherencia del circuito eléctrico bulbar en animales EO en comparación con los animales control durante la estimulación con acetato de amilo 99% (p<0.05, n=6; U Mann Whitney, Anexo: Figura 27, histogramas).

Por el contrario, la coherencia durante la estimulación con acetato de amilo al 99% de los animales EO mostró una disminución significativa en comparación con los animales control en la banda de frecuencia gamma rápido (80-200 Hz; p<0.05, n=6; U Mann Whitney, Figura 16).



**Figura 16. Efecto del EO sobre la coherencia intrabulbar de las oscilaciones poblacionales inducidas por acetato de amilo al 99% en la frecuencia gamma rápido (80-200 Hz) en animales control (A) y EO (B).** Se muestran matrices de coherencia (en escala de color) entre todos los electrodos localizados en el BOP. Note un decremento en la coherencia global en los animales EO. En (C) se muestra una matriz de significancia de las coherencias comparadas entre los dos grupos experimentales (U Mann Whitney). Las celdas en blanco indican que un valor de p<0.05, realizando la comparación entre la matriz de los animales controles vs EO. Se muestran histogramas de frecuencia de los valores de coherencia de todo el circuito bulbar. Los valores fueron obtenidos de la matriz de coherencia a la izquierda para cada caso. Note una reducción en los valores de coherencia de los animales EO. \* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control (p<0.05).

El análisis de la coherencia bulbar durante la estimulación con esencia de canela, mostró un incremento en la coherencia en las frecuencias delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), Beta (10-30 Hz) y Gamma (30-40 Hz) en animales enriquecidos olfatoriamente en comparación con los animales control (n=6;  $p < 0.05$ , U Mann Whitney; Anexos: Figura 28 A-C). De manera interesante, en la coherencia gamma rápido (80-200 Hz) de los animales enriquecidos con aromas se observa una disminución de los valores de coherencia tras la estimulación con esencia de canela en comparación con los animales control (Figura 17 A-B; n=6;  $p < 0.05$ ; U Mann Whitney). En las comparaciones realizadas para cada electrodo la estimulación con esencia de canela indica una disminución de los valores de coherencia para casi la totalidad de los electrodos situados en el bulbo olfatorio ( $p < 0.05$ , n=6; U Mann Whitney, Figura 17 C).

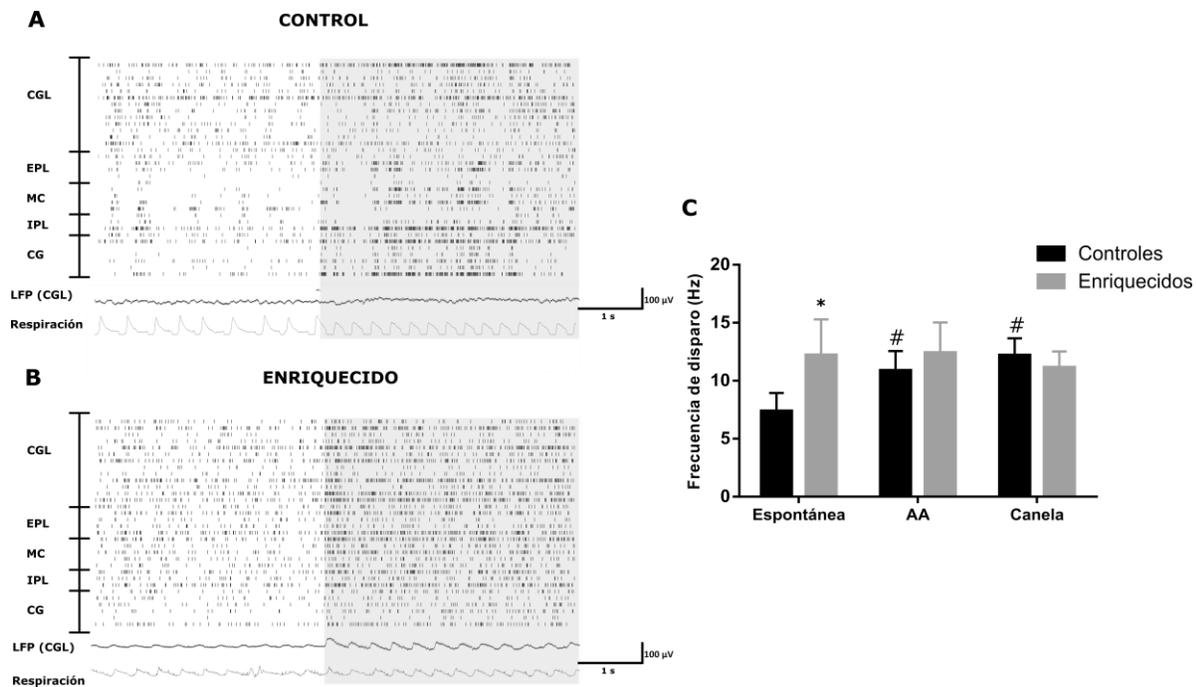


**Figura 17. Efecto del EO sobre la coherencia intrabulbar de las oscilaciones poblacionales inducidas por esencia de canela en la frecuencia gamma rápido (80-200 Hz) en animales control (A) y EO (B).** Se muestran matrices de coherencia (en escala de color) de todos los electrodos localizados en el BOP. Note un decremento en la coherencia global en los animales EO. En (C) se muestra una matriz de significancia de las coherencias comparadas entre los dos grupos experimentales (U de Mann Whitney). Las celdas en blanco indican que un valor de  $p < 0.05$  realizando la comparación entre la matriz de los animales controles vs EO. Se muestran histogramas de frecuencia de los valores de coherencia de todo el circuito bulbar. Los valores fueron obtenidos de la matriz de coherencia a la izquierda para cada caso. Note una reducción de los valores de coherencia de los animales EO. \* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

### 8.3 Evaluación del efecto del EO sobre la red olfatoria bulbar.

Además de caracterizar los cambios en las interacciones entre las distintas capas del BOP inducidos por el EO mediante el análisis de la actividad poblacional, también caracterizamos los cambios de las interacciones neuronales en la red por medio del análisis de la correlación en los disparos registrados como MUAS y SUAS en el mismo arreglo de electrodos.

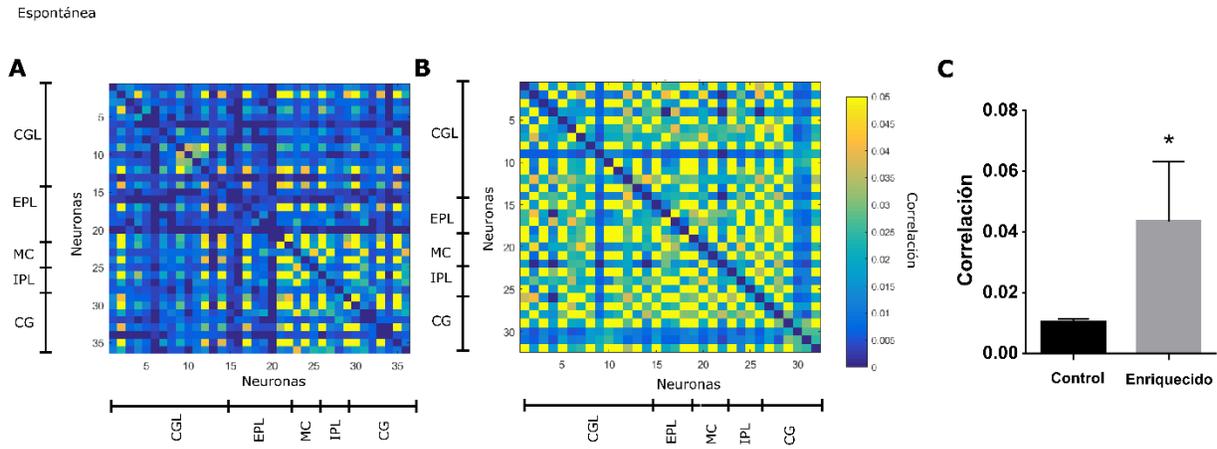
El análisis de la frecuencia de disparo de la actividad neuronal del bulbo olfatorio indica un incremento de la frecuencia de disparo en la actividad espontánea en animales enriquecidos con aromas comparados con los animales control ( $p < 0.05$ ,  $n=4$ , Figura 18 A-C). No se reportan diferencias significativas entre ambos grupos en la actividad inducida con acetato de amilo al 99% y con esencia de canela ( $p > 0.05$ ,  $n=4$ , Figura 18 A-C). Así mismo, encontramos un incremento significativo de la frecuencia de disparo tras la estimulación con acetato de amilo al 99% y con esencia de canela comparado con la frecuencia de disparo de la actividad espontánea en los animales control ( $p < 0.05$ ;  $n=4$ ; Figura 18 A y C). No se reportan diferencias significativas en la actividad inducida con aromas en los animales enriquecidos con aromas con respecto de la actividad espontánea ( $p > 0.05$ ;  $n=4$ ; Figura 18 B-C).



**Figura 18. Frecuencia de disparo de la actividad espontánea e inducida con aromas de animales EO y controles.** Se muestra un *raster* de los disparos neuronales en la actividad espontánea e inducida con acetato de amilo al 99% (cuadro gris) en un animal control (A) y EO (B). Para cada uno se muestra un trazo representativo del potencial local de campo (LFP) de la capa glomerular (CGL) del BOP y la respiración. (C) Histograma de la frecuencia de disparo (Hz) de la actividad espontánea e inducida con acetato de amilo (AA) al 99% y esencia de canela. (n=6, en ambos grupos). Los valores son representados como la media  $\pm$  EEM. \* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). # indica una diferencia significativa con respecto de la actividad espontánea del control ( $p < 0.05$ ).

Para evaluar las interacciones funcionales entre los SUAS y MUAS identificados en los registros, se llevó a cabo un análisis de la correlación cruzada clásica (Nieto-Posadas *et al.*, 2014). Además, con la finalidad de conocer la topología de la red neuronal del BOP en las diferentes condiciones experimentales realizamos la cuantificación del número de conexiones, el número de nodos, la densidad de conexión promedio, la longitud característica, la eficiencia y el coeficiente de agrupamiento. Las matrices de adyacencia obtenidas del análisis de correlación cruzada (CORR-X), indican un incremento de la fuerza de las interacciones neuronales del circuito bulbar en la actividad espontánea de los animales EO comparadas con los animales control (Figura 19 A-B). Se reporta un incremento significativo en el valor de la correlación global en los animales

enriquecidos con aromas comparados con los controles (Figura 19-C;  $p < 0.05$ ;  $n = 4$ ; U Mann Whitney).



**Figura 19. Efectos del EO sobre las interacciones funcionales entre las neuronas del circuito bulbar.** Matrices representativas de las correlaciones cruzadas (escala de colores) para animales control (**A**) y EO (**B**) entre los elementos neuronales (MUAS y SUAS) registrados en el BOP. Note un incremento de los valores de correlación para las interacciones obtenidas en los registros de los animales EO en comparación con el control. **C**) Correlación global en animales control y EO. Note un incremento en los valores de correlación en los animales EO comparados con el control ( $n = 4$ , en ambos grupos). Los valores son representados como la media  $\pm$  EEM. \* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

Con las matrices de adyacencia obtenidas del análisis de la correlación cruzada durante la actividad espontánea bulbar, se llevaron a cabo cuantificaciones de parámetros descriptivos basados en la teoría de grafos (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 1. Del mismo se desprende que cuando se comparan los animales EO con los animales control no se observan diferencias significativas en cuanto al número de conexiones totales de la red (Tabla 1;  $p > 0.05$ ;  $n = 4$ ; U Mann Whitney). Tampoco se reportan diferencias significativas en el número de nodos (SUAS y MUAS) encontrados en la red bulbar entre animales EO y animales control (Tabla 1;  $p > 0.05$ ;  $n = 4$ ; U Mann Whitney). Por el contrario, se reporta un incremento significativo de la densidad de conexión promedio, la eficiencia y el coeficiente de agrupamiento en los animales EO en comparación con los animales control (Tabla 1;  $p < 0.05$ ;  $n = 4$ ; U Mann Whitney). También se reporta una disminución de la longitud característica en la red

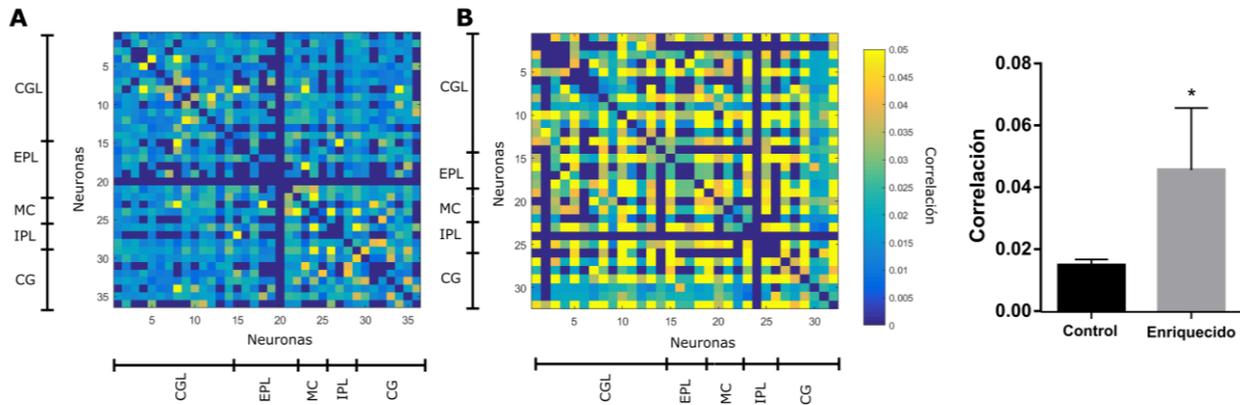
bulbar de los animales enriquecidos con aromas en comparación con los animales control (Tabla 1;  $p < 0.05$ ;  $n = 4$ ; U Mann Whitney).

		Número de conexiones	Número de nodos	Densidad de conexión promedio	Longitud característica	Eficiencia	Coefficiente de agrupamiento
Controles	CORR-X	483.3 ± 25.94	34±1	0.850±0.04	122.69±17.40	0.01±0.002	0.009±0.0019
EO	CORR-X	511.3 ± 17.96	33±1	<b>*0.970±0.02</b>	<b>*54.38±15.25</b>	<b>*0.04±0.020</b>	<b>*0.034±0.0140</b>

**Tabla 1. Parámetros de la red bulbar obtenida de los análisis de correlación del disparo durante la actividad espontánea.** Se muestran los valores obtenidos para los animales EO y controles. Los valores son mostrados como la media ± el EEM ( $n = 4$ , en ambos grupos). \*indica diferencias significativas entre los animales EO y sus respectivos controles. Los valores que son significativamente diferentes también se indican en letras negritas ( $p < 0.05$ ).

Las matrices de adyacencia obtenidas del análisis de CORR-X, indican un incremento de la fuerza de las interacciones neuronales del circuito bulbar en la actividad inducida con acetato de amilo al 99% de los animales EO comparada con los animales control (Figura 20 A-B). Se reporta un incremento significativo del valor de la correlación global durante la estimulación con acetato de amilo al 99% en los animales enriquecidos con aromas comparados con el control (Figura 20-C;  $p < 0.05$ ;  $n = 4$ ; U Mann Whitney).

Acetato de amilo al 99%



**Figura 20. Efectos del EO sobre las interacciones funcionales entre las neuronas del circuito bulbar durante la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99%.** Matrices representativas de las correlaciones cruzadas (escala de colores) para animales control **(A)** y EO **(B)** entre los elementos neuronales (MUAS y SUAS) registrados en el BOP. Note un incremento de los valores de correlación para las interacciones obtenidas en los registros de los animales EO en comparación con el control. **(C)** Correlación global en animales control y EO. Note un incremento en los valores de correlación en los animales EO comparados con el control (n=4, en ambos grupos). Los valores son representados como la media  $\pm$  EEM. \* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

Las matrices de adyacencia obtenidas del análisis de correlación de la actividad inducida durante la estimulación con acetato de amilo 99% permitieron realizar las cuantificaciones de los parámetros descriptivos basados en la teoría de grafos (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 2. Estos indican que cuando se comparan los animales EO con el control no se observan diferencias significativas en cuanto al número de conexiones totales de la red (Tabla 2;  $p > 0.05$ ; n=4; U Mann Whitney). Tampoco se reportan diferencias significativas en el número de nodos (SUAS y MUAS) ni en la densidad de conexión promedio encontrados en la red bulbar entre animales EO y animales control (Tabla 2;  $p > 0.05$ ; n=4; U Mann Whitney). Por el contrario, se reporta un incremento significativo de la densidad de la eficiencia y el coeficiente de agrupamiento en los animales EO en comparación con los animales control (Tabla 2;  $p < 0.05$ ; n=4; U Mann Whitney). También se reporta una disminución significativa de la longitud característica en la red bulbar de los animales enriquecidos con aromas en comparación con los animales control (Tabla 2;  $p < 0.05$ ; n=4; U Mann Whitney).

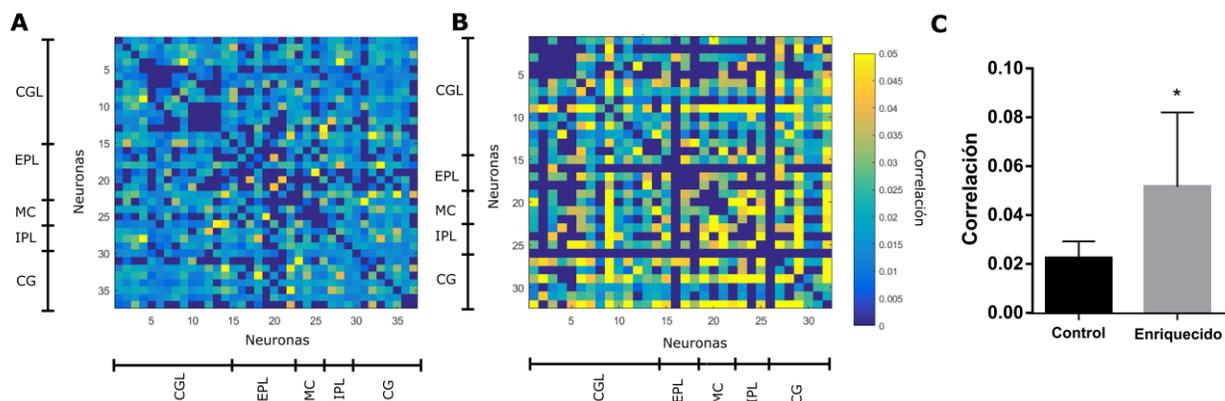
		Número de conexiones	Número de nodos	Densidad de conexión promedio	Longitud característica	Eficiencia	Coefficiente de agrupamiento
Controles	CORR-X	485.0±20.16	34±1	0.836±0.04	69.13±13.85	0.018±0.002	0.015±0.0010
EO	CORR-X	495.5±48.98	33±1	0.920±0.06	<b>*35.88±9.87</b>	<b>*0.051±0.021</b>	<b>*0.040±0.0140</b>

+

**Tabla 2. Parámetros de la red bulbar obtenida de los análisis de correlación del disparo durante la actividad inducida con acetato de amilo al 99%.** Se muestran los valores obtenidos para los animales EO y controles. Los valores son mostrados con la media y el EEM (n=4, en ambos grupos). \*indica diferencias significativas entre los animales EO y sus respectivos controles. Los valores que son significativamente diferentes también se indican en letras negras ( $p < 0.05$ ).

En cuanto a la actividad bulbar inducida con aroma de canela, las matrices de adyacencia obtenidas de la CORR-X, indican un incremento de la fuerza de las interacciones neuronales del circuito bulbar de los animales EO comparadas con los animales control (Figura 21 A-B). Se reporta un incremento significativo del valor de la correlación global durante la estimulación con esencia de canela en los animales enriquecidos con aromas comparados con el control (Figura 20-C;  $p < 0.05$ ; n=4; U Mann Whitney).

Esencia de canela



**Figura 21. Efectos del EO sobre las interacciones funcionales entre las neuronas del circuito bulbar durante la estimulación olfatoria con esencia de canela.** Matrices representativas de las correlaciones cruzadas (escala de colores) para animales control (A) y EO (B) entre los elementos neuronales (MUAS y SUAS) registrados en el BOP. Note un incremento de los valores de correlación para las interacciones obtenidas en los registros de los animales EO en comparación con el control. C) Correlación global en animales control y EO. Note un incremento en los valores de correlación en los animales EO comparados con el control (n=4, en ambos grupos). Los valores son representados como la media  $\pm$  EEM. \*denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

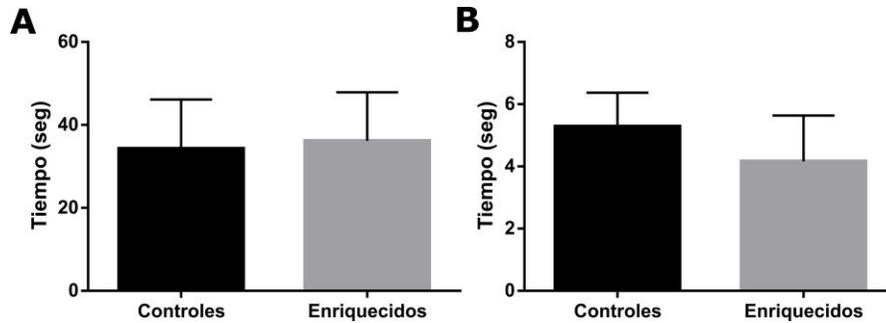
Las matrices de adyacencia obtenidas del análisis de la correlación cruzada de la actividad inducida con esencia de canela permitieron realizar las siguientes cuantificaciones de los parámetros descriptivos basados en la teoría de grafos (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 3. Esta indica que tanto los animales EO como los controles no muestran diferencias significativas en cuanto al número de conexiones, el número de nodos, la densidad de conexión promedio, la longitud característica, la eficiencia y el coeficiente de agrupamiento (Tabla 3; n=4 para ambos grupos; p >0.05; U Mann Whitney).

		Número de conexiones	Número de nodos	Densidad de conexión promedio	Longitud característica	Eficiencia	Coficiente de agrupamiento
Controles	CORR-X	517±22.42	35±1	0.876±0.049	54.30±80.02	0.027±0.009	0.021±0.005
EO	CORR-X	491±62.90	33±1	0.876±0.075	41.25±14.55	0.056±0.031	0.045±0.023

**Tabla 3. Parámetros de la red bulbar obtenida de los análisis de correlación del disparo durante la actividad inducida con esencia de canela.** Se muestran los valores obtenidos para los animales EO y controles. Los valores son mostrados con la media y el EEM (n=4, en ambos grupos). No se reportan diferencias significativas entre los grupos (p>0.05).

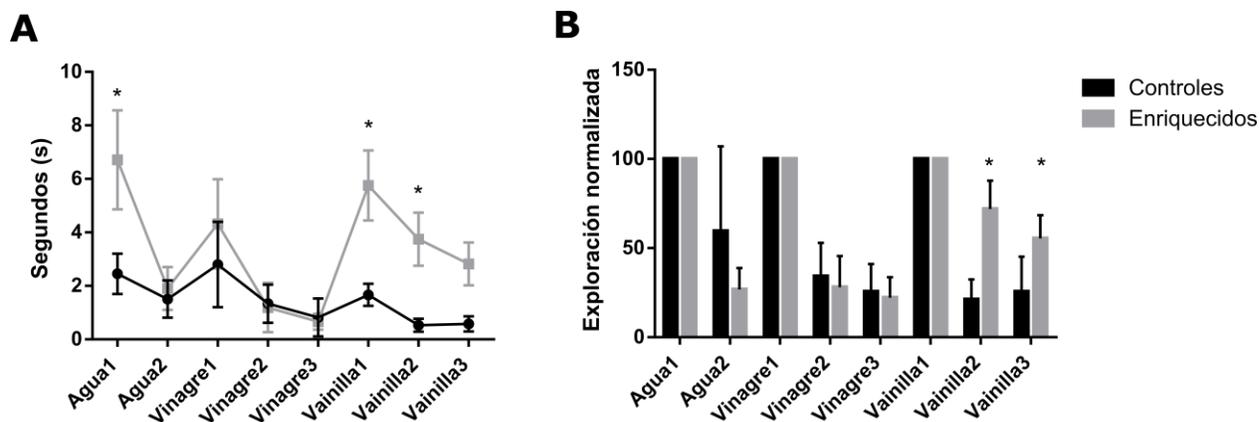
#### 8.4 Evaluación del efecto del EO sobre la detección y discriminación olfatorias.

Con la finalidad de evaluar la función olfatoria en los animales EO empleamos, inicialmente, la prueba de alimento enterrado. En esta prueba no se observan diferencias significativas en el desempeño entre los animales EO con respecto de los animales control. Lo anterior, con relación al tiempo que les tomó a los animales encontrar un trozo de galleta escondido aleatoriamente en una de las esquinas de la caja de prueba. La cuantificación de la latencia de llegada al sitio donde se encontraba la galleta, así como el tiempo requerido para desenterrarla, mostraron valores similares entre ambos grupos (Figura 22; n=7; p>0.05; U Mann Whitney).



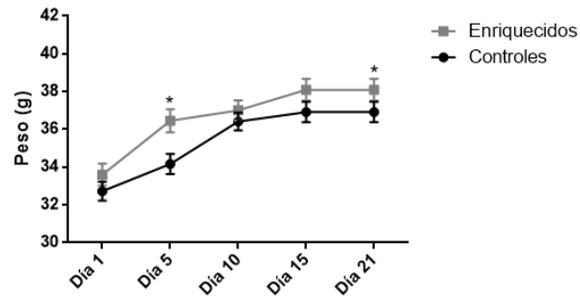
**Figura 22. Evaluación de la capacidad olfatoria mediante la prueba de alimento enterrado. (A)** La gráfica muestra la latencia para encontrar un trozo de alimento enterrado en los animales controles (barra negra) y EO (barra gris). No se observan diferencias significativas entre los grupos. **(B)** La gráfica muestra la latencia de llegada al sitio donde se encontraba escondido el alimento. No se reportan diferencias significativas en ambos grupos ( $n=7$ ;  $p>0.05$ ; los valores son representados como la media  $\pm$  EEM).

Otra prueba que nos permite evaluar el aprendizaje, la discriminación y la detección olfatoria en roedores es la prueba de habituación-deshabitación (Yang & Crawley, 2009; Wesson *et al.*, 2010). El desempeño general de los animales en la prueba demuestra que ambos grupos de animales reducen el tiempo de exploración de un aroma cuando éste es presentado repetidamente en 3 ocasiones seguidas (Figura 23;  $n=6$  para ambos grupos;  $p>0.05$ ), indicando que ambos grupos de animales presentan el fenómeno de habituación olfatoria. De manera interesante, los animales EO muestran un tiempo de exploración incrementado ante la primera exposición tanto de agua destilada como de esencia de vainilla al 1% v/v comparados con los animales control (Figura 23-A;  $n=6$  para ambos grupos;  $p<0.05$ ; U Mann Whitney). Adicionalmente, realizamos el análisis de la exploración normalizada con respecto del primer ensayo con odorante, lo que muestra que si bien la habituación tanto a la exposición a agua como a vinagre es la misma en ambos grupos de animales, la habituación a la presentación de vainilla es menor en animales EO comparados con animales del grupo control (Figura 23-B;  $n=6$  para ambos grupos;  $p<0.05$ ).



**Figura 23. Evaluación de la discriminación y aprendizaje olfatorios mediante la prueba de habituación- deshabituación. (A)** La gráfica muestra el tiempo de exploración para cada uno de los odorantes presentados durante la prueba (1% v/v), tanto para animales controles (línea negra), como para animales EO (línea gris). Note un incremento en la exploración de los animales EO en el primer ensayo con agua y en los primeros ensayos con vainilla y vinagre **(B)** Normalización del tiempo de exploración al primer ensayo de cada bloque (indicado como el 100%) para ambos grupos. Note un incremento significativo en el porcentaje de exploración de los animales EO en el último bloque. Los datos son presentados como la media  $\pm$  EEM (n=6). \*denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

Finalmente, es importante mencionar que al finalizar el EO los animales mostraron un incremento en la masa corporal, por lo que se realizó el análisis temporal del peso de los animales sometidos al EO y los animales controles. Interesantemente, los animales EO muestran un incremento significativamente mayor en el peso en el día 5 comparado con los animales control (Figura 24; n=12; para ambos grupos;  $p < 0.05$ ). En este día los animales EO presentan un peso de  $36 \text{ g} \pm 0.43 \text{ g}$  lo que es significativamente mayor en comparación con los animales control quienes exhiben un peso de  $34.17 \text{ g} \pm 0.53 \text{ g}$  (Figura 24; n=12; para ambos grupos;  $p < 0.05$ ). Adicionalmente se reporta un incremento significativo de los animales EO al finalizar el EO en comparación con los animales control (Figura 24; n=12; para ambos grupos;  $p < 0.05$ ). Los animales EO muestran un peso de  $40 \text{ g} \pm 0.71$  lo que es significativamente mayor en comparación con los animales control quienes presentan un peso de  $37.42 \text{ g} \pm 0.49 \text{ g}$  (Figura 24; n=12; para ambos grupos;  $p < 0.05$ ).



**Figura 24. Evaluación del peso corporal de los animales sometidos a EO.** Se grafica el peso corporal a través del periodo experimental. Note un mayor incremento en el peso en el día 5 y 21 de los animales EO con respecto del control. Los datos son presentados como la media  $\pm$  EEM (n=12, en ambos grupos). \*denota una diferencia significativa con respecto al grupo control (p<0.05).

## 9. DISCUSIÓN

El bulbo olfatorio es altamente plástico (Coppola, 2012; Tong *et al.*, 2014), pues presenta cambios moleculares y celulares diversos a través de procesos regulados por la experiencia (Bonzano *et al.*, 2014; Mandairon *et al.*, 2006), por lo que el paradigma usado en este estudio, el “enriquecimiento olfatorio”, generó diversos cambios en este microcircuito. En este trabajo se demostró que el enriquecimiento olfatorio (EO) es capaz de inducir procesos plásticos en el bulbo olfatorio principal (BOP) que se reflejan en cambios de la activación glomerular, en la potencia de la actividad poblacional y en cambios en las relaciones funcionales intrabulbares. Lo anterior, en condiciones basales y en presencia de olores incluidos en el protocolo de EO y con un aroma novedoso. Estas modificaciones en las interacciones neuronales del BOP inducidas por el EO correlacionan con un incremento en la discriminación de olores. De manera interesante, también encontramos que los animales expuestos al protocolo de EO presentaron un incremento en el peso corporal. A continuación se discuten dichos resultados.

En primer lugar, nuestro trabajo indica que el EO modifica el patrón de activación glomerular en respuesta a la exposición a odorantes. Este cambio involucra un incremento en el tamaño de los glomérulos (Figura 25). Dicho hallazgo se pudiera explicar por un aumento en el número de terminales axónicas de las neuronas sensoriales olfatorias que inervan glomérulos específicos del BOP, probablemente como producto de una redistribución de las terminales axónicas (Monjarez-Fuentes *et al.*, 2017). Lo mismo se observa con estimulaciones aromáticas por periodos cortos de tiempo, similares al EO (Monjarez-Fuentes *et al.*, 2017). Probablemente este incremento en el tamaño glomerular también esté relacionado con un aumento en el número de las dendritas apicales de las células mitrales (Liu *et al.*, 2016) y un incremento en el número de interneuronas glomerulares (Bonzano *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016), como producto de la estimulación repetida con aromas, tal y como se observa con una exposición corta a odorantes (Liu *et al.*, 2016). Este incremento en el tamaño glomerular, es similar al reportado en animales que han sido expuestos a un solo odorante por periodos cortos de tiempo (Woo *et al.*, 1987; Monjarez-Fuentes *et al.*, 2017). En estas condiciones experimentales con estimulación monoaromática de corta duración no sólo se produce un incremento en el tamaño glomerular (Woo *et al.*, 1987), sino que también éste se asocia con un aumento en el número de receptores olfatorios como el MI7

(Valle-Leija *et al.*, 2012; Monjarez-Fuentes *et al.*, 2017) y el M72 (Valle-Leija *et al.*, 2012). El incremento en el tamaño glomerular también ha sido reportado previamente por Todrank y colaboradores (Todrank *et al.*, 2011) en neonatos que fueron expuestos a odorantes que activan a los receptores M71 y M72 durante la gestación y la lactancia (Todrank *et al.*, 2011). Lo anterior es relevante debido a que los glomérulos presentan un proceso de maduración y refinamiento en el periodo post-natal (Meisami & Sendera, 1993) y a que cambios en el ambiente olfatorio temprano pueden resultar en cambios notables en la morfología glomerular (Valle-Leija *et al.*, 2012; Monjarez *et al.*, 2017). Interesantemente, así como se muestra en esta tesis, los glomérulos de los ratones adultos son también altamente plásticos y refinan sus respuestas tras la exposición repetida a un aroma en particular, o a una gama amplia de aromas (Valle-Leija *et al.*, 2012; Bonzano *et al.*, 2014), como es el caso del EO (Martončíková *et al.*, 2011). Los cambios plásticos inducidos por el EO podrían modificar no sólo la recepción de la señal por parte de los glomérulos olfatorios, sino que además pudieran contribuir al refinamiento de su respuesta a los aromas. Tal como se observa en el incremento en la capacidad para detectar aromas a bajas concentraciones en los animales EO. Es importante mencionar que en nuestro estudio empleamos ratones adultos que ya presentan “glomérulos maduros” que están formados exclusivamente por axones que expresan el mismo tipo de receptor a odorante (Treloar *et al.*, 2002). Con base en lo anterior, es posible deducir que el EO puede producir cambios en las neuronas receptoras olfatorias que inervan la capa glomerular del BOP, independientemente de la edad de los ratones (Mombaerts *et al.*, 1996; Valle-Leija *et al.*, 2012; Monjarez *et al.*, 2017).

Los resultados de esta tesis también indican que tanto la activación con acetato de amilo como con esencia de canela, activan un patrón glomerular denso en la superficie bulbar en animales control y enriquecidos con aromas (Figura 25). Esta activación está asociada a la naturaleza de los aromas que constituye un factor importante que influye en los patrones de activación glomerular (Lin Da *et al.*, 2006; Vincis *et al.*, 2012). Los odorantes naturales, como los aceites esenciales o ciertas frutas como el platano, generan patrones glomerulares densos en la superficie bulbar en comparación con moléculas específicas de ciertos aromas como el benzaldehído y la carvona que activan patrones glomerulares más discretos (Johnson *et al.*, 2010; Zhou & Belluscio, 2012; Gschwend *et al.*, 2016; Vincis *et al.*, 2015). Sin embargo, los animales en ambientes enriquecidos presentan un patrón de activación glomerular menos denso (menos glomérulos activados) comparados con los animales control, lo que indicaría que el EO genera un refinamiento en la

activación glomerular que favorece la activación específica de una menor cantidad de glomérulos en contraste a una activación más inespecífica (más glomérulos activados) en animales control. Esto permitiría a los animales EO una transducción de la información olfatoria a sitios más profundos del bulbo olfatorio como la capa mitral y granular, de una forma más eficiente, con menos “ruido” y con menos recursos (Wilson *et al.*, 2017).

Nuestros datos también muestran que el EO reduce el número de glomérulos activados ante aromas “conocidos” (p.e. acetato de amilo) y “desconocidos”. Es importante destacar que la reorganización glomerular depende en gran medida de las interacciones axo-axónicas de las neuronas sensoriales olfatorias con las neuronas localizadas en los glomérulos del bulbo olfatorio (Petrovic & Shmuker, 2015). En el axón de estas neuronas sensoriales olfatorias se encuentran receptores olfatorios que controlan la generación de señales intracelulares a través de la generación del AMPc (Petrovic & Shmuker, 2015). El AMPc inicia una ruta molecular que determina la posición de las terminales axónicas de las neuronas sensoriales olfatorias en el eje antero-posterior del bulbo olfatorio (Petrovic & Shmuker, 2015). Se ha demostrado que aquellas neuronas sensoriales olfatorias que expresan altos niveles de AMPc tienen blancos celulares en la región posterior del bulbo olfatorio (Petrovic & Shmuker, 2015; Nishizumi & Sakano, 2015). En nuestro trabajo no encontramos diferencias significativas en cuanto a la posición de los glomérulos bulbares. Sin embargo, el incremento en el tamaño glomerular y su reducción en número, podrían estar relacionados con estos procesos moleculares que les permiten a las terminales axónicas establecer contactos con áreas específicas de la capa glomerular del bulbo olfatorio (Serizawa *et al.*, 2006; Petrovic & Shmuker, 2015; Nishizumi & Sakano, 2015). Este hallazgo, relacionado con la disminución en el número de glomérulos activos por la estimulación con canela y acetato de amilo en animales EO, es contrario a lo reportado por Valle-Lejia y colaboradores (2012), quienes observaron que la estimulación con heptaldehído (HD) durante 20 días postnatales incrementa el número de glomérulos que expresan el receptor MI7 que une específicamente este aroma (Valle-Lejia *et al.*, 2012). Sin embargo, este incremento en el número de glomérulos tras la estimulación con heptaldehído (HD) durante 20 días no fue reproducido en animales adultos, por lo que la explicación más simple de las diferencias entre nuestros resultados y estos, son los cambios que ocurren durante el desarrollo temprano (Petrovic & Schmuker, 2015).

El proceso de refinamiento de los mapas glomerulares producido por el EO no sólo se refleja en una menor cantidad de glomérulos activados por un aroma, sino en que esos glomérulos probablemente son activados con mayor potencia, muy probablemente debido a un incremento de la actividad neuronal (Grinvald *et al.*, 1999; Zepeda *et al.*, 2004). Lo anterior, se refleja en un incremento en el área activada por glomérulo, misma que incrementaría por dos razones probables, la primera sería un incremento en el tamaño glomerular *per se* o, alternativamente, este incremento en el tamaño glomerular pudiera deberse a la activación más potente de regiones fuera de foco que contribuyen al aumento en el área glomerular evaluada en la superficie bulbar. Ambas posibilidades requieren ser evaluadas experimentalmente, la primera histológicamente y la segunda por microscopía multifotónica.

En cuanto a la dinámica de activación glomerular, los animales enriquecidos con aromas presentan un incremento significativo en la absorbancia tras la estimulación con canela comparados con los animales control. Esta observación coincide con reportes de un incremento en la magnitud y en la diversidad de activación glomerular producidos por el reclutamiento de interneuronas ubicadas en la capa glomerular del bulbo olfatorio (Spors *et al.*, 2006; Gire & Schoppa, 2009). La actividad postsináptica glomerular es controlada principalmente por las interacciones entre las interneuronas periglomerulares del circuito bulbar (Nagayama *et al.*, 2015). Reportes recientes indican que un periodo de exposición prolongado a aromas incrementa el número de elementos neuronales en el circuito glomerular (Martončíková *et al.*, 2011; Bonzano *et al.*, 2014). Lo anterior, sugiere que el incremento en la respuesta glomerular de los animales enriquecidos con aromas podría estar relacionado con un incremento en las interacciones neuronales de dicho circuito local (Martončíková *et al.*, 2011; Bonzano *et al.*, 2014). Otro factor importante que influye en la magnitud de la activación glomerular es la concentración de los odorantes (Spors *et al.*, 2006). Numerosos reportes con técnicas de imagenología de calcio (Spors *et al.*, 2006), imagenología óptica intrínseca (Rubin & Katz, 1999) y resonancia magnética funcional (Yan *et al.*, 1998), señalan la existencia de un incremento en la respuesta olfatoria que depende directamente de la concentración de los aromas (Spors *et al.*, 2006; Gschwend *et al.*, 2016). En nuestro trabajo, la estimulación con aromas se llevó a cabo con la misma concentración con la finalidad de descartar esta variable, lo que favorece la hipótesis de que nuestra observación se debe un incremento en las

interacciones neuronales que se producen a nivel glomerular en el BOP (Spors *et al.*, 2006; Gire & Schoppa, 2009; Nagayama *et al.*, 2015).

Los datos de nuestro trabajo también indican que los animales enriquecidos presentan cambios en los mapas glomerulares no sólo en respuesta a un aroma incluido en el EO (acetato de amilo) sino a un aroma completamente novedoso (esencia de canela). Este efecto observado tras la estimulación con esencia de canela en animales enriquecidos podría deberse a que la canela, un aroma constituido por diversas moléculas aromáticas (Singh *et al.*, 2007; Escanilla *et al.*, 2008; Rao & Gan, 2014), activa receptores olfatorios previamente activados por algunas moléculas contenidas en otros aromas aplicados durante el EO. Tal es el caso del cinamaldehído, una de las moléculas principales de la esencia de canela, que activa receptores MOR42-3 (Bavan *et al.*, 2014) y OR10A6 de las neuronas sensoriales olfatorias (De March *et al.*, 2015). Otro ligando de estos receptores es el *eugenol*, presente también en los compuestos aromáticos de la canela (Rao & Gan, 2014) que le da su aroma característico al clavo de hojas (Aguilar-González & López-Malo, 2013; Cortés-Rojas *et al.*, 2014). Es importante mencionar que el clavo de hojas forma parte de los 21 aromas utilizados en nuestro protocolo de enriquecimiento olfatorio, por lo que una posible explicación de la similitud de efecto del EO sobre la activación glomerular por canela y acetato de amilo, podría estar relacionada directamente con la activación de los receptores MOR42-3 y OR10A6 por parte de las moléculas aromáticas que componen a la esencia de canela (Singh *et al.*, 2007; Escanilla *et al.*, 2008; Rao & Gan, 2014; Bavan *et al.*, 2014) y, posiblemente, por parte de otras moléculas presentes en otros odorantes aplicados durante el EO. Alternativamente, existe la posibilidad de que los cambios en el microcircuito glomerular producidos por el EO se generalicen no sólo a los aromas aplicados durante el EO o las vías neuronales activadas durante el mismo, sino a todo el sistema glomerular del BOP. El uso de aromas monomoleculares durante el EO y durante la toma de los mapas glomerulares podría ayudar a corroborar o desechar esta posibilidad. Independientemente de cuál sea la extensión de los cambios observados en los mapas glomerulares, nuestros hallazgos sugieren que el EO produce modificaciones importantes en el circuito glomerular que se originan de la amplia gama de odorantes presentados y que se refleja en un refinamiento en la respuesta glomerular aun de aromas no familiares.

De manera interesante, se ha reportado que una manipulación de la activación glomerular conlleva a modificaciones de la frecuencia de disparo en las neuronas mitrales y empenachadas del

bulbo olfatorio (Gschwend *et al.*, 2016; Lehmann *et al.*, 2016). En nuestro trabajo, al evaluar el potencial de campo local (LFP) del circuito eléctrico bulbar de animales EO, demostramos que la aplicación de aromas produce un incremento en la actividad bulbar que es de mayor magnitud comparada a la que se observa en animales control (Figura 25). Se sabe, que la estimulación con aromas aumenta la magnitud de la actividad del bulbo olfatorio (Kay, 2014). Este incremento en la magnitud del LFP en respuesta a los aromas implica la participación de un mayor número de neuronas en la generación de la actividad del bulbo olfatorio (Kay, 2014). En nuestro trabajo, dicho incremento se observó en las capas glomerular, mitral y granular del BOP, indicando cambios plásticos en dichas regiones, posteriores al protocolo de enriquecimiento olfatorio. El análisis de la potencia relativa en bandas de frecuencia indica una disminución de la potencia en las oscilaciones lentas (delta-theta). Estas oscilaciones están gobernadas principalmente por la respiración (Rojas-Líbano *et al.*, 2014), pues un bloqueo de la respiración nasal es capaz de abolirlas completamente (Phillips *et al.*, 2012). Considerando la importancia de los ciclos respiratorios para el mantenimiento de las oscilaciones delta-theta bulbares, es importante mencionar que los ciclos respiratorios cambian de frecuencia dependiendo del estado en el que se encuentre el animal (Fontanini *et al.*, 2003; Courtiol *et al.*, 2011; Esclassan *et al.*, 2012; Mori, 2014). Por ejemplo, en libre movimiento la frecuencia respiratoria puede ser de 6-10 Hz (Courtiol *et al.*, 2011; Mori, 2014), mientras que en anestesia profunda se reduce de 3-8 Hz (Fontanini *et al.*, 2003; Courtiol *et al.*, 2011; Esclassan *et al.*, 2012; Mori, 2014). En nuestro estudio, todos los animales permanecieron en anestesia profunda durante el registro electrofisiológico y dicha anestesia fue muy similar en todos los casos. De hecho, la frecuencia respiratoria y la amplitud de los esfuerzos respiratorios fueron similares en ambos grupos (datos no mostrados). Excluyendo a los cambios en la respiración como responsables de los cambios en el ritmo theta inducidos por el EO, es posible que la disminución en la potencia relativa del ritmo theta que observamos en la actividad espontánea e inducida con aromas se deba a cambios en el epitelio olfatorio (Carey & Wachowiak, 2011) o a cambios en las interacciones neuronales bulbares. Esta idea está apoyada por el trabajo realizado por Gray & Skinner (1998), quienes reportaron que las vías centrífugas de bulbo olfatorio también regulan la generación de las oscilaciones theta bulbares (Gray & Skinner, 1988), lo que sugiere que el incremento en la potencia relativa de las oscilaciones bulbares del BOP en esta banda de frecuencia, podría deberse a cambios plásticos a nivel de la corteza olfatoria como producto del

EO. Lo anterior, en virtud de que gran parte de las fibras centrífugas que inervan al BOP provienen de esta corteza (Mori, 2014; Imai, 2014)

Nuestro trabajo también reporta un incremento significativo de la potencia en la banda de frecuencia beta después del EO (Figura 25). Estas oscilaciones en el BOP dependen en gran medida de la retroalimentación proveniente de la corteza piriforme (Neville & Haberly, 2003). Esta corteza es altamente plástica y recibe aferencias directas de las células mitrales y empenachadas (Wilson & Sullivan, 2011). Tal como se discutió al final del párrafo anterior, esta observación en la actividad beta reafirma la hipótesis que los cambios en el BO después del EO pudieran deberse a un cambio a nivel cortical, así como en las interacciones neuronales de las células de proyección (mitrales y empenachadas) con la corteza cerebral. Reiterando, las oscilaciones beta del BOP han sido de particular interés en la percepción de los aromas (Neville & Haberly, 2003; Kay *et al.*, 2014). Trabajos de Neville & Haberly (Neville & Haberly, 2003), indican que una lesión del tracto olfatorio lateral abole las oscilaciones beta del bulbo olfatorio, sugiriendo una participación de regiones corticales como la corteza piriforme en la generación de este ritmo bulbar (Neville & Haberly, 2003). Es por ello, que el incremento de la potencia beta en la actividad espontánea e inducida con aromas en los animales enriquecidos podría reflejar no sólo los cambios en el circuito bulbar, sino que sugiere cambios importantes a nivel cortical, lo que abre las puertas a nuevas vías de investigación para tratar de entender los cambios fisiológicos que subyacen al enriquecimiento olfatorio en la corteza cerebral.

De manera interesante, también encontramos un incremento de las oscilaciones gamma en capas más profundas del bulbo olfatorio, tanto en la actividad espontánea como inducida con aromas, después del EO. Los ritmos gamma bulbares en el LFP incrementan su amplitud y frecuencia tras la inhalación de sustancias aromáticas (Neville & Haberly, 2003; Rosero & Aylwin, 2011; Manabe & Mori 2013). Estas oscilaciones rápidas reflejan las descargas sincronizadas de las células mitrales y empenachadas (Kashiwadani *et al.*, 1999). Además, las sinapsis dendodendríticas de las neuronas de proyección (células mitrales y empenachadas) y las interneuronas del bulbo olfatorio, principalmente las células granulares, participan en la generación de las oscilaciones gamma bulbares (Lagier *et al.*, 2004). En nuestro trabajo, encontramos que los animales enriquecidos con aromas muestran un incremento en la potencia de las oscilaciones gamma comparados con los animales control, sugiriendo un incremento de la sinapsis dendodendríticas

entre las células mitrales/empenachadas y las células granulares. Como ya se mencionó, se ha reportado que esta actividad oscilatoria incrementa su potencia tras la estimulación con aromas (Beshel *et al.*, 2007; Frederick *et al.*, 2016) y que un incremento en la potencia y la frecuencia de esta banda de frecuencia refleja la experiencia olfatoria previa y un cambio en la conducta olfatoria en los animales (Bressler, 1988; Chabaud *et al.*, 2000; Kay & Freeman 1998; Ravel *et al.* 2003).

Esta actividad potenciada se relaciona con mejoras en tareas de discriminación olfatoria que se origina independientemente de cambios en las bandas de frecuencia theta y beta (Beshel *et al.*, 2007). Todo lo anterior sugiere que el incremento en la potencia de los ritmos gamma en los animales enriquecidos con aromas podría optimizar la resolución del estímulo olfatorio cuando la señal de entrada es ambigua, como en el caso de los enantiómeros aromáticos (Beshel *et al.*, 2007). Como ya se mencionó, se ha reportado que las oscilaciones gamma lentas y rápidas, representan la actividad de la red de células mitrales y empenachadas del bulbo olfatorio (Manabe & Mori, 2013). Fukunaga y colaboradores mostraron una asociación de la actividad de las neuronas empenachadas con el gamma rápido al inicio de la inspiración y las células mitrales con la inhalación más tardía (Fukunaga *et al.*, 2012). El incremento de la potencia en gamma de los animales enriquecidos permitiría una mejor respuesta ante estímulos olfatorios y reflejaría cambios importantes en la dinámica de las neuronas de proyección en el bulbo olfatorio. Adicionalmente, el incremento en la potencia gamma y gamma rápido en los animales EO, especialmente en regiones como la CGL, la CM y la CG, probablemente esté relacionado con un incremento de la inhibición en el circuito, puesto que dichos patrones oscilatorios se relacionan mayormente con la inhibición del circuito neuronal, producto de las interacciones de las interneuronas del BOP. El rol de las interneuronas inhibitorias en el sistema nervioso central después de una experiencia sensorial, constituye una de las posibles explicaciones de la reconfiguración de los circuitos neuronales (Sun, 2009). Por ejemplo, en sitios distantes al bulbo olfatorio, específicamente a nivel cortical, se ha demostrado (Sun, 2009) que la corteza de los barriles reconfigura los disparos neuronales después de la remoción de los bigotes en ratones GAD67-GFP, presumiblemente mediante un incremento en la inhibición del circuito. Recientemente, Nunes y Kuner (2015) reportaron que un incremento en la inhibición en la sinapsis dendrodendrítica de las CG hacia las CM, induce un incremento de la discriminación olfatoria en roedores carentes de la subunidad  $\beta 3$  de los receptores a GABA-A. Estas subunidades se expresan primordialmente en las CG del BOP (Wisden *et al.*, 1992; Pirker *et al.*, 2000). También se ha reportado que la activación de estos receptores por la liberación de GABA

proveniente de las células de Golgi y de Blanes regula la ya mencionada inhibición dendrodentrítica. Así, una inhibición aumentada a las CM estaría generando modificaciones en la percepción sensorial en roedores (Nunes & Kuner, 2015). Esto concuerda con los datos presentados en este trabajo en los que los animales EO que fueron evaluados en la prueba de habituación y deshabituación mostraron una mejor detección y discriminación en comparación con los animales control.

Adicionalmente, nuestro trabajo indica un incremento en la coherencia para todas las bandas de frecuencia en la actividad espontánea de los animales enriquecidos olfatoriamente, principalmente en las capas profundas del BOP (capa granular). En estos animales, la coherencia presenta un incremento importante para casi todas las capas del BOP cuando los animales son estimulados con acetato de amilo y con esencia de canela. Un incremento en la coherencia supone un refinamiento en la respuesta olfatoria que involucra la reconfiguración del circuito bulbar (Kay et al., 2010) y un incremento en la eficacia de la comunicación de las redes neuronales (Buszaki & Shomburg, 2015) del BOP. Sin embargo, la coherencia de la actividad gamma rápida en los animales EO mostró una disminución, posiblemente debido al incremento en frecuencia de disparo que presentan los animales EO (Buszaki & Shomburg, 2015). A pesar de que los índices de correlación del disparo neuronal indican un incremento de la coordinación entre neuronas, el hecho de que observemos una disminución en la coherencia de la actividad gamma podría estar relacionado con un incremento en la correlación de las interacciones neuronales en regiones particulares del BOP y en bandas de frecuencia diferentes al gamma. Tal es el caso de la capa de células granulares que incrementan su tasa de disparo (Zhou *et al.*, 2016) en coordinación con oscilaciones gamma lenta (Lagier et al., 2004). Así mismo, esta disminución en la coherencia gamma podría reflejar modificaciones importantes en la comunicación neuronal con regiones corticales distantes (Buszaki & Shomburg, 2015). Se requieren estudios de conectividad que relacionen la actividad bulbar de los diferentes estratos neuronales y de la actividad de la corteza olfatoria para confirmar esta hipótesis. Hasta el momento los reportes existentes de la coherencia de las oscilaciones neuronales entre diferentes áreas cerebrales, tales como el BOP, indican que la coherencia está involucrada en una variedad de funciones, que dependen del estado fisiológico del animal (Li *et al.*, 2010). De hecho, alteraciones en la coherencia están estrechamente relacionadas con la aparición de diversas patologías como el Alzheimer, el Parkinson, la esquizofrenia, entre otras (Uhlhaas & Singer., 2006). Específicamente, Liu *et al* (2013), mostraron una alteración de la

coherencia bulbar en un modelo de la enfermedad del Alzheimer. Lo que resalta la importancia de entender la dinámica bulbar con regiones cerebrales involucradas en el procesamiento de la información olfatoria.

La funcionalidad de la red bulbar implica la participación sincrónica de diversos componentes neuronales (Nagayama *et al.*, 2014). Diversos trabajos, incluido el nuestro, han mostrado que la estimulación olfatoria, aguda o crónica, induce cambios plásticos en la actividad de los componentes neuronales del BOP (Coopersmith & Michael, 1984; Mandairon *et al.*, 2006; Todrank *et al.*, 2010; Martončíková *et al.*, 2011). En particular, el enriquecimiento olfatorio disminuye la frecuencia de disparo en las neuronas de proyección (Zhou *et al.*, 2016) e incrementa la tasa de disparo de las células granulares (Zhou *et al.*, 2016). Esto último permitiría entender el incremento en la frecuencia de disparo global en los animales EO, lo que refleja el incremento en la inhibición del circuito. Así mismo, el EO incrementa la neurogénesis bulbar (Martončíková *et al.*, 2011; Bonzano *et al.*, 2014; Lazarini *et al.*, 2014), y produce un incremento de la inhibición del circuito por parte de las células granulares (Rosselli-Austin & Williams, 1990; Zhou *et al.*, 2016). Estos trabajos dan cuenta de la importancia de considerar las interacciones neuronales del bulbo olfatorio como un todo. Es por ello, que en el presente trabajo tratamos de entender las relaciones funcionales neuronales del bulbo olfatorio por medio de un análisis de correlación y la aplicación de la teoría de grafos (Sporns, 2011). Entre los hallazgos más relevantes del presente trabajo, destaca la modificación de las conexiones funcionales del circuito bulbar después del EO. Es importante mencionar que estas relaciones funcionales se establecieron a través de la coactividad neuronal mediante un análisis de correlación cruzada clásico (Nieto-Posadas *et al.*, 2014; Pérez-Ortega, 2016). Este análisis muestra que los animales enriquecidos con aromas presentan un incremento en la coactividad neuronal, que se observa en la actividad espontánea y en la inducida con aromas (acetato de amilo 99% y esencia de canela). Lo anterior sugiere un incremento en la actividad coordinada de las respuestas excitatorias e inhibitorias del circuito bulbar. Mandairon y colaboradores (Mandairon *et al.*, 2006), señalan que estos cambios plásticos dependen en gran medida de las sinapsis dendodendríticas inhibitorias que incluyen la participación de receptores NMDA en el circuito bulbar (Isaacson & Strowbridge, 1998; Mandairon *et al.*, 2006).

Además de lo discutido en el párrafo anterior, con respecto al análisis de la correlación del disparo neuronal, los parámetros para describir la red neuronal bulbar como el número de nodos,

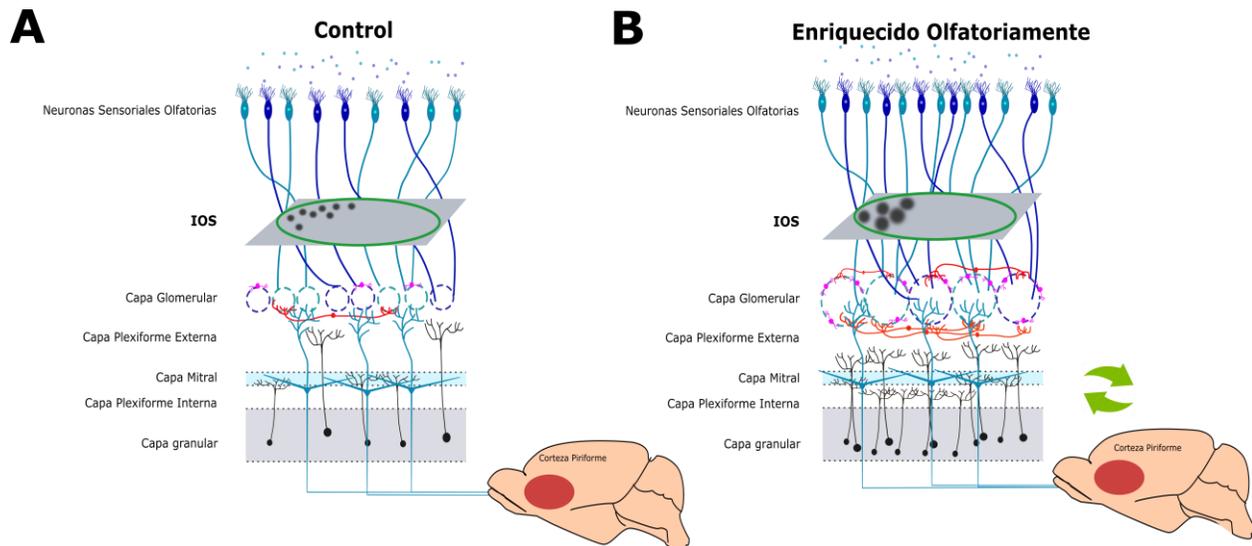
número de enlaces, la longitud característica, el coeficiente de agrupamiento y la densidad de enlaces (Newman *et al.*, 2003; Boccaletti *et al.*, 2005; Pérez-Ortega *et al.*, 2016), indican importantes cambios en la configuración de la red después del EO. En primer lugar, el número de nodos (neuronas) no fue diferente entre los grupos, pero la longitud característica promedio del microcircuito bulbar fue de  $L > 2$  para ambos grupos, indicando muchas conexiones polisinápticas y una baja eficiencia en la comunicación de los elementos neuronales de la red bulbar en ambos grupos (Newman *et al.*, 2003; Boccaletti *et al.*, 2005). Sin embargo, los animales enriquecidos con aromas muestran un incremento en la eficiencia comparado con el control, lo que reflejaría un refinamiento del circuito y una mejora en la comunicación neuronal comparados con el control (Newman *et al.*, 2003; Boccaletti *et al.*, 2005). Las neuronas en la red bulbar exhiben coeficientes de agrupamiento (C) muy bajos indicando que las neuronas del bulbo olfatorio están distribuidas en grupos distantes (Newman *et al.*, 2003; Boccaletti *et al.*, 2005).

Los hallazgos funcionales del presente trabajo sugieren cambios plásticos en la red neuronal bulbar en respuesta al EO que permiten a los animales enriquecidos responder eficientemente a los estímulos olfatorios. Tal como se observa en las pruebas olfatorias en esta tesis. El enriquecimiento olfatorio genera diversas modificaciones en el bulbo olfatorio (Fletcher & Wilson, 2002; Buonviso & Chaput, 2000; Martončíková *et al.*, 2011) que subyacen a su vez alteraciones en la conducta olfatoria de los animales (Mandairon *et al.*, 2006c). Uno de los más importantes, involucra el incremento de los mecanismos inhibitorios en el bulbo olfatorio principal (Rocheffort *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2016). Diversos reportes indican que un incremento en la inhibición por parte de las células granulares del circuito eléctrico bulbar permite una mejora de la discriminación de aromas (Abraham *et al.*, 2010; Nunes & Kuner, 2015). Adicionalmente, Buonviso y colaboradores (Buonviso *et al.*, 1998; Buonviso & Chaput, 2000) demostraron que un periodo corto de exposición a aromas es capaz de disminuir la responsividad de las células mitrales a los aromas. Esto posiblemente debido al incremento de células inhibitorias granulares en el circuito bulbar (Rocheffort *et al.*, 2002), quienes se encargan de la inhibición de las células mitrales. Esta sinapsis entre células mitrales y granulares (Shepherd & Greer, 1990) podría constituir uno de los mecanismos de mayor importancia para la discriminación olfatoria. Lo que podría permitir al circuito del BOP dar una respuesta más eficiente como lo que se ha visto en humanos (Rabin, 1998) y en ratas adultas (Mandairon *et al.*, 2006c) donde se ha demostrado que la exposición prolongada a diversos aromas mejora la discriminación ante enantiómeros aromáticos (Mandairon *et al.*,

2006c). Lo anterior, pudiera deberse a un incremento de la inhibición que permite refinar el circuito y evitar el solapamiento de las respuestas bulbares, específicamente de las neuronas mitrales ante aromas similares estructuralmente (Fletcher & Wilson, 2003). De hecho, como ya se mencionó, el enriquecimiento olfatorio incrementa el número de interneuronas en la capa glomerular del bulbo olfatorio, permitiéndole al sistema contenerse contra los retos del medio ambiente (Bonzano *et al.*, 2014). En particular, en nuestro trabajo la concentración de los diferentes odorantes supone un reto en la percepción olfatoria. Se ha demostrado que las neuronas de la capa glomerular son capaces de activarse con concentraciones bajas de un odorante (Rubin & Katz., 1999). Bajas concentraciones de un aroma pueden evocar una respuesta en los glomérulos más sensibles del bulbo olfatorio y conforme la concentración del aroma incrementa se reclutan glomérulos menos sensibles. Este fenómeno se conoce como “*concepto de primacía*” (Wilson *et al.*, 2017). El enriquecimiento olfatorio podría permitir al circuito glomerular sensibilizar su respuesta a aromas en una baja concentración. Lo anterior sugiere importantes modificaciones en la red neuronal bulbar (Figura 25), que permiten refinar las respuestas olfatorias que serán finalmente procesadas en la corteza olfatoria primaria (Chandra & Barkai, 2017).

Diversos trabajos alrededor del mundo señalan que el enriquecimiento ambiental, incluido el olfatorio, es capaz de generar modificaciones de la actividad neuronal de diversos sistemas sensoriales y, al mismo tiempo, en la conducta (Turner *et al.*, 2002; Moucha *et al.*, 2005; Cancedda *et al.*, 2004). Nuestros resultados indican que el EO genera una modificación en ambos niveles, la actividad neuronal y la conducta olfatoria. Adicional y sorprendentemente, encontramos que los animales que fueron expuestos al EO presentan un incremento gradual en el peso corporal, probablemente como resultado de la exposición a aromas novedosos. Reportes previos indican que neonatos expuestos a un ambiente enriquecido olfatoriamente presentan un incremento en el consumo de sustancias novedosas (Hennessy *et al.*, 1977), lo que podría explicar el aumento del peso observado en nuestros animales sometidos al protocolo de EO, como producto de un incremento en el consumo de alimento. Lo anterior es relevante puesto que existe una estrecha relación con el consumo alimenticio y el sistema olfatorio. Actualmente se sabe que la activación del sistema olfatorio induce patologías como desórdenes metabólicos y diabetes (Riera *et al.*, 2017), mediante la regulación de receptores como el IGF1 en las neuronas sensoriales olfatorias (Riera *et al.*, 2017). Además el sistema olfatorio está estrechamente relacionado con el sistema digestivo y es capaz de regular a la baja el consumo de alimentos durante el envejecimiento

(Seiberling & Conley, 2004). Se requieren investigaciones que permitan entender estos y probablemente otros cambios en el metabolismo de los animales enriquecidos con aromas, mismos que pudieran influenciar el incremento en la ganancia de peso en los animales sometidos al EO.



**Figura 25. Especulaciones acerca del efecto del enriquecimiento olfatorio sobre el circuito bulbar.** Los animales control **(A)** muestran un mayor número de glomérulos activos con un área más reducida en comparación con los animales enriquecidos olfatoriamente **(B)**. Probablemente debido a un incremento en el número de interneuronas en la capa glomerular y de las terminales axónicas de las NSO **(B)** (Monjarez-Fuentes *et al.*, 2017). Así mismo, el EO incrementa la neurogénesis en la capa granular del BOP (Martončíková *et al.*, 2011), lo que llevaría a un incremento en las interacciones dendodendríticas que se producen entre las células mitrales y granulares en los animales EO **(B)**. Además, el incremento observado en las oscilaciones en el rango de frecuencia beta, sugieren importantes modificaciones a nivel de la corteza olfatoria (Neville & Haberly, 2003), ya que las fibras centrifugas que provienen de dicha corteza modulan estos patrones oscilatorios **(B)**. Por último, el incremento en la coherencia bulbar y en los índices de correlación en los disparos neuronales que se producen desde la capa glomerular hasta la capa granular del BOP, permite sugerir un refinamiento del circuito que se manifiesta tanto en la actividad espontánea como inducida con aromas.

## 10. CONCLUSIONES

- El EO indujo un cambio en la activación de la capa glomerular en el BOP inducida con un aroma conocido y uno novedoso, produciendo un incremento en el tamaño glomerular y una disminución en el número de los mismos.
- El EO modifica la actividad poblacional del BOP, disminuyendo la potencia de la actividad eléctrica espontánea e incrementando la tasa de activación durante la estimulación con aromas novedosos y conocidos.
- El EO incrementa la coherencia de la actividad eléctrica bulbar tanto en la actividad espontánea como en la inducida con aromas, en todas las bandas de frecuencia.
- El EO induce un incremento de la fuerza de las interacciones neuronales intrabulbares, generando un incremento en la eficiencia y una disminución de la longitud característica
- El EO incrementa la capacidad de detección y la discriminación de aromas a una baja concentración.
- El EO induce un incremento en el peso corporal.

## 11. REFERENCIAS

- Abraham NM, Egger V, Shimshek DR, Renden R, Fukunaga I, Sprengel R, Seeburg PH, Klugmann M, Margrie TW, Schaefer AT, Kuner T (2010) Synaptic inhibition in the olfactory bulb accelerates odor discrimination in mice. *Neuron*. 65 (3): 399-411.
- Adrian ED (1950) Sensory discrimination with some recent evidence from the olfactory organ. *Brit Med Bull*. 6(3): 30–333.
- Afifi KA (1999) *Neuroanatomía Funcional. Texto y atlas*. 2ª edición. Editorial Mc Graw Hill.
- Aguilar-González AE, López-Malo A (2013) Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. *Temas selectos de Ingenieria de alimentos*. 7 (2):35-41.
- Aungst JL, Heyward PM, Puche AC, Karnup SV, Hayar A, Szabo G, Shipley MT (2013) Centre surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature*. 426(6967):623-9.
- Araneda R (2017) *Neuromodulation in the olfactory bulb*. University of Maryland. Recuperado de <http://www.clfs.umd.edu/biology/aranedalab/research.html>.
- Armony J, Trejo-Martínez D, Hernández D (2012) *Resonancia Magnética Funcional: Principios y aplicaciones en Neuropsicología y Neurociencias cognitivas*. Revista *Neuropsicología Latinoamericana*. 4: 36-50.
- Attems J, Walker L, Jellinger KA (2015) Olfaction and aging: A mini review. *Gerontology*. DOI: 10.1159/000381619.
- Baker H, Kawano T, Margolis FL, Joh TH (1983) Transneuronal regulation of tyrosine hydroxylase expression in olfactory bulb of mouse and rat. *J. Neurosci.*, 3,69–78.
- Bastien-Dionne PO, David LS, Parent A, Saghatelian A (2010) Role of sensory activity on chemospecific populations of interneurons in the adult olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, 518, 1847–1861.

- Bavan S, Sherman B, Luetje CW, Abaffy T (2014). Discovery of Novel Ligands for Mouse Olfactory Receptor MOR42-3 Using an In Silico Screening Approach and In Vitro Validation. *PLoS ONE*, 9(3), e92064.
- Beshel J, Kopell N, Kay LM (2007) Olfactory bulb gamma oscillations are enhanced with task demands. *J Neurosci*. 27(31):8358-65.
- Bi G-Q, Poo M-M (2001) Synaptic modification by correlated activity: Hebb's postulate revisited. *Annu Rev Neurosci* 24:139–166.
- Blanco-Hernández E, Valle-Leija P, Zomosa-Signoret V, Drucker-Colín R, Vidaltamayo R (2012) Odor memory stability after reinnervation of the olfactory bulb. *PLoS One*. 7(10):e46338.
- Bocaletti S, Latora V, Moreno Y, Chavez M, Hwang DU (2006) Complex networks: Structure and dynamics. *Physics Reports*. 425(4-5): 175-308.
- Bonzano S, Bovetti S, Fasolo A, Peretto P, De Marchis S (2014) Odour enrichment increases adult-born dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *Eur J Neurosci*. 40(10):3450-7.
- Bovetti S1, Peretto P, Fasolo A, De Marchis S (2007) Spatio Temporal specification of olfactory bulb interneurons. *J Mol Histol*. (6):563-9.
- 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.
- Brea J, Kay L, Kopell N (2009) Biophysical model for gamma rhythms in the olfactory bulb via subthreshold oscillations. *PNAS*. 106 (51): 21954- 21959.
- Bressler SL (1988) Changes in electrical activity of rabbit olfactory bulb and cortex to conditioned odor stimulation. *Behav Neurosci* 102: 740–747.
- Brown B, Hendrix S (2014) Partial correlation coefficients. *Wiley StatsRef*. 1-8.
- Buck L.B. (1996) Information coding in the vertebrate olfactory system, *Annu. Rev. Neurosci*. 19 517–544.

- Buonviso N, Revial MF, Jourdan F (1991) The Projections of Mitral Cells from Small Local Regions of the Olfactory Bulb: An Anterograde Tracing Study Using PHA-L (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin). *Eur J Neurosci* 3:493-500
- Buonviso N, Gervais R, Chalansonnet M, Chaput M (1998) Short lasting exposure to one odour decrease general reativity in the olfactory bulb of adults rats. *European Journal of Neuroscience*. 10, 2472-2475.
- Buonviso N, Chaput M (2000) Olfactory experience decreases responsiveness of the olfactory bulb in the adult rat. *Neuroscience*. 95 (2):325-332.
- Bushdid C, Magnasco M, Vosshall L, Keller A (2014) Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science*. 343: 1370–1372.
- Buzsáki G, Watson B (2012) Brain rhythms and neural syntax: implications for efficient coding of cognitive content and neuropsychiatric disease. *Dialogues clin Neurosci*. 14(4): 345-367.
- Buzsáki G, Schomburg EW (2015) What does gamma coherence tell us about inter-regional neural communication? *Nature neuroscience*.18 (4):484-489.
- Cancedda L, Putignano E, Sale E, Viegi A, Berardi N, Maffei L (2004) Acceleration of visual system development by environmental enrichment. *J Neurosci*. 24(20):4840-4848.
- Chabaud P, Ravel N, Wilson DA, Mouly AM, Vigouroux M, Farget V, Gervais R (2000) Exposure to behaviourally relevant odour reveals differential characteristics in rat central olfactory pathways as studied through oscillatory activities. *Chem Senses* 25: 561–573.
- Chandra n, Barkai E (2017) A non-synaptic mechanism of complex learning: Modulation of intrinsic neuronal excitability. *Neurobiol Learn Mem*.
- Chery R1, L'Heureux B, Bendahmane M, Renaud R, Martin C, Pain F, Gurden H. (2011) Imaging odor-evoked activities in the mouse olfactory bulb using optical reflectance and autofluorescence signals. *J Vis Exp*. (56):e3336.

- Christie JM, Bark C, Hormuzdi SG, Helbig I, Monyer H, Westbrook GL (2005) Connexin36 mediates spike synchrony in olfactory bulb glomeruli. *Neuron* 46:761-772.
- Cho J, Prince J, Cutforth T, Cloutier J (2011) The pattern of glomerular map formation defines responsiveness to aversive odorants in mice. *Journal of Neuroscience*, 31(21), 7920-7926.
- Cleland TA, Sethupathy P (2006). Non-topographical contrast enhancement in the olfactory bulb. *BMC Neurosci*; 7: 7.
- Cleland TA (2010) Early transformations in odor representation. *Trends Neurosci.* (3):130-9.
- Cortés-Rojas DF, de Souza CR F, Oliveira WP (2014) Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2), 90–96.
- Seiberling KA, Conley DB (2004) Aging and olfactory and taste function. *Otolaryngol Clin North Am.* (6):1209-28, vii.
- Coopersmith R, Henderson SR, León M (1986) Odor specificity of the enhanced neural response following early odor experience in rats. *Brain Res.* 392(1 -2):191 -7.
- Coopersmith R, León M (1986) Enhanced neural response by adult rats to odors experienced early in life. *Brain Res.* 371(2):400-3.
- Coppola DM (2012). *Studies of Olfactory System Neural Plasticity: The Contribution of the Unilateral Naris Occlusion Technique.* *Neural Plasticity*, 2012, 351752.
- Courtiol E, Hegoburu C, Litaudon P, Garcia S, Fourcaud-Trocmé N, Buonviso N (2011) Individual and synergistic effects of sniffing frequency and flow rate on olfactory bulb activity. *J Neurophysiol.* 106(6):2813-24.
- Crossman AR, Neary D (2007) *Neuroanatomía: Texto y Atlas en Color.* 3ª edic. Edit. Masson-Elsevier.
- De March CA, Ryu S, Sicard G, Moon C, Golebiowski J (2015) Structure–odour relationships reviewed in the postgenomic era. *Flavour Fragr. J.*, 30: 342–361.
- Escanilla O, Mandairon N, Linster C (2008) Odor-reward learning and enrichment have similar effects on odor perception. *Physiology & Behavior.* 621-626.

- Esclassan F, Courtiol E, Thévenet M, Garcia S, Buonviso N, Litaudon P (2012) Faster, Deeper, Better: The Impact of Sniffing Modulation on Bulbar Olfactory Processing. *PLoS ONE*, 7(7), e40927.
- Fletcher M, Wilson D (2003) Olfactory bulb mitral-tufted cell plasticity: Odorant-specific tuning reflects previous odorant exposure. *Journal of Neuroscience*, 23, 6946 – 6955.
- Fontanini A, Spano P, Bower JM (2003) Ketamine-xylazine-induced slow (< 1.5 Hz) oscillations in the rat piriform (olfactory) cortex are functionally correlated with respiration. *J Neurosci*. 23(22):7993-8001.
- Friedman-Hill S, Maldonado PE, Gray CM (2000) Dynamics of striate cortical activity in the alert macaque: I. Incidence and stimulus-dependence of gamma-band neuronal oscillations. *Cereb Cortex* 10:1105-1116.
- François D, Emmanuelle C, Nathalie B, Nicolas F (2015) Competing mechanisms of gamma and beta oscillations in the olfactory bulb based on multimodal inhibition of mitral cells over respiratory cycle. *eNeuro*. 2(6) 1-24.
- Franklin K, Paxinos G (2007) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 3<sup>a</sup> edición. Elsevier.
- Frederick DE, Brown A, Brim E, Mehta N, Vujovic M, Kay LM (2016). Gamma and Beta Oscillations Define a Sequence of Neurocognitive Modes Present in Odor Processing. *The Journal of Neuroscience*, 36(29), 7750–7767.
- Fukunaga I, Berning M, Kollo M, Schmaltz A, Schaefer A (2012) Two distinct Channels of olfactory bulb output. *Neuron*. 75(2): 320-329.
- Fukunaga I, Herb JT, Kollo M, Boyden ES, Schaefer, AT (2014). Independent control of gamma and theta activity by distinct interneuron networks in the olfactory bulb. *Nat Neurosci*; 17(9), 1208-1216.
- Fourcaud-Trocme N, Courtiol E, Buonviso N (2014) Two distinct olfactory bulb sublaminal networks involved in gamma and beta oscillation generation: a CSD study in the anesthetized rat. *Front Neural Circuits*; 8: 88.
- Gazzaniga M, Bizzi E, Black I, Caramazza A, Grafon S, Heatherton T, Koch C, LeDoux J, Logothetis N, Movshon A, Phelps E, Rakic P, Schacter D, Treisman A, Wandell B. (2004) *The cognitive neurosciences III*. Massachusetts Institute of technology.

- Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM (2000) Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1823-1828.
- Gire DH, Schoppa NE (2009) Control of on/off glomerular signaling by a local GABAergic microcircuit in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(43), 13454–13464.
- Gray CM, Skinner JE (1988) Centrifugal regulation of neuronal activity in the olfactory bulb of the waking rabbit as revealed by reversible cryogenic blockade. *Exp. Brain Res.* 69, 378–386
- Grinvald, A.A, Shoham D, Shmuel A, Glaser D, Vanzetta I, Shtoyerman E, Slovin H, Wijnbergen C, Hildesheim R, Arieli A, et al. (1999). In vivo optical imaging of cortical dynamics. In *Modern Techniques in Neuroscience Research*, U. Windhorst and H. Johansson, eds. (Springer Berlin-Heidelberg). 893–969.
- Grishagin IV (2015) Automatic cell counting with ImageJ. *Anal Biochem.* 473:63-5.
- Gschwend O, Beroud J, Vincis R., Rodriguez I & Carleton A (2016). Dense encoding of natural odorants by ensembles of sparsely activated neurons in the olfactory bulb. *Scientific Reports*, 6, 36514.
- Gusmão I, Monteiro B, Cornélio G, Fonseca C, Moraes M, Pereira G (2011) Odor-enriched environment rescues long-term social memory, but does not improve olfaction in social isolated adult mice. *Behavioural Brain Research.* 440-446.
- Guthrie KM, Gall CM (1995) Functional mapping of odor-activated neurons in the olfactory bulb. *Chem Senses* 20:271-282.
- Haehner A, Tosch C, Wolz M, Klingelhofer L, Fauser M, Storch A, Reichmann H, Hummel T (2013) Olfactory training in patients with Parkinson's disease. *Plos One.* 8:4 e61680.
- Haines D (2002) *Principios de neurociencias*. Elsevier Science. Segunda edición. España.
- Hatt H (2004) Molecular and cellular basis of human olfaction. *Chem Biodivers.* 12: 1857-69.
- Haass C, Selkoe D (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:101 -112.

- Hawkes C, Doty R (2009) *The Neurology of olfaction*. Cambridge University Press. New York. 241p.
- Hennessy MB, Smotherman WP, Levine S (1977) Early olfactory enrichment enhances later consumption of novel substances. *Physiol Behav.* 19(4):481 -3.
- Hernández-Soto R. (2015) *Cambios en la actividad eléctrica bulbar in vivo inducidos por el enriquecimiento olfatorio*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Huang L, Garcia I, Jen HI, Arenkiel B (2013) Reciprocal connectivity between mitral cells and external plexiform layer interneurons in the mouse olfactory bulb. *Front Neural Circuits.* 7:32.
- Imam N, Cleland TA, Manohar R, Merolla PA, Arthur JV, Akopyan F, Modha DS (2012) Implementation of olfactory bulb glomerular-layer computations in a digital neurosynaptic core. *Front Neurosci.* 6:83.
- Johnson M, Biju K, Hoffman J, Fadool D (2013) Odor enrichment sculpts the abundance of olfactory bulb mitral cells. *Neurosci Lett.* 0:173-178.
- Johnson BA, Leon M (2007) Chemotopic odorant coding in a mammalian olfactory system. *J Comp Neurol* 503:1-34.
- Johnson BA, Ong J, Leon M (2010). Glomerular Activity Patterns Evoked by Natural Odor Objects in the Rat Olfactory Bulb Are Related to Patterns Evoked by Major Odorant Components. *The Journal of Comparative Neurology.* 518(9), 1542–1555.
- Kandel E, Schwartz H, Jessell T, Agud Aparicio J (2001) *Principios de neurociencia* (4a ed., 1a ed. en español). Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España.
- Kashiwadani H, Sasaki YF, Uchida N, Mori K (1999) Synchronized oscillatory discharges of mitral/tufted cells with different molecular receptive ranges in the rabbit olfactory bulb. *J Neurophysiol.* 82(4):1786-92.
- Kay LM, Freeman WJ (1998) Bidirectional processing in the olfactory-limbic axis during olfactory behavior. *Behav Neurosci* 112:541-553

- Kay L (2005) Theta oscillations and sensorimotor performance. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3863–3868, 2005.
- Kay LM, Beshel J, Brea J, Martin C, Rojas-Líbano D and Kopell N (2009) Olfactory oscillations: the what, how and what for. *Trends Neurosci.* 32: 207–214.
- Kay LM, Beshel J (2010) A Beta Oscillation Network in the Rat Olfactory System During a 2-Alternative Choice Odor Discrimination Task. *Journal of Neurophysiology*, 104(2), 829–839.
- Kay L (2014) Circuit Oscillations in odor perception and memory. *Progress in Brain Research.* 208: 223-251.
- Kay L (2015) Olfactory system oscillations across phyla. *Current opinion in Neurobiology* 31, 141-147.
- Kerr M, Belluscio L (2006) Olfactory experience accelerates glomerular refinement in the mammalian olfactory bulb. *Nat. Neurosci.* 9: 484–486.
- Kumar A, Singh A, Ekavali (2015) A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: and update. *Pharmacological Reports.* 67: 195-203.
- Lagier S, Carleton A, Lledo PM (2004) Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates gamma oscillations in the rat olfactory bulb. *J. Neurosci;* 24, 4382–4392.
- Lehmann A, D'Errico A, Vogel M, Spors H (2016). Spatio-Temporal Characteristics of Inhibition Mapped by Optical Stimulation in Mouse Olfactory Bulb. *Frontiers in Neural Circuits*, 10, 15.
- Lepousez G, Lledo PM (2013) Odor Discrimination Requires Proper Olfactory Fast Oscillations in Awake Mice. *Neuron;* 80(4): 1010-1024
- León M, Johnson B (2006) Functional units in the olfactory system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14985-14986.
- Liao K, Liu D, Zhu L (2012) Enriched odour exposure decrease tau phosphorylation in the rat hippocampus and cortex. *Neuroscience Lett.* 507(1): 22-26.

- Li AA1, Gong L, Liu Q, Li X, Xu F (2010) State-dependent coherences between the olfactory bulbs for delta and theta oscillations. *Neurosci Lett.* 9; 480(1):44-8.
- Lazarini F, Gabellec MM, Moigneu C, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Lledo PM. (2014) Adult neurogenesis restores dopaminergic neuronal loss in the olfactory bulb. *J Neurosci.* 34(43):14430-42.
- Lin Da Y, Shea SD, Katz LC (2006) Representation of natural stimuli in the rodent main olfactory bulb. *Neuron.* 50 (6): 937-949.
- 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. *Neurosci Lett.* 545:81-5.
- Liu A, Savva S, Urban NN (2016). Early Odorant Exposure Increases the Number of Mitral and Tufted Cells Associated with a Single Glomerulus. *The Journal of Neuroscience*, 36(46), 11646–11653.
- Livneh Y, Adam Y, Mizrahi A (2014) Odor processing by adult-born neurons. *Neuron.* 81(5):1097-110.
- Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD (2005) Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev* 85:281-317
- Lowry C, Kay L (2007) Chemical factors determine olfactory system beta oscillations in waking rats. *Journal of Neurophysiology.* 98 (1): 394-404.
- Lowe G (2013) *Olfactory bulb: Synaptic Organization.* eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020289.pub2. 1 -10.
- Macrides F, Chorover SL (1972) Olfactory bulb units: activity correlated with inhalation cycles and odor quality. *Science* 175:84-87.
- Macrides F, Schneider S (1982). Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster. *J. Comp. Neurol.* 208: 419– 430.
- Manabe H, Mori K (2013) Sniff rhythm-paced fast and slow gamma-oscillations in the olfactory bulb: relation to tufted and mitral cells and behavioral states. *J Neurophysiol.* 110:1593-1599.

- Mandaïron N, Stack C, Kiselycznyk C, Linster C (2006) Broad activation of the olfactory bulb produces long-lasting changes in odor perception. *PNAS*. 103 (36): 13543-13548.
- Mandaïron N, Stack C, Christiane L (2006b) Olfactory enrichment improves the recognition of individual components in mixtures. *Physiology & Behavior*. 89: 379-385.
- Mandaïron N, Stack C, Kiselycznyk C, Linster C (2006c) Enrichment to odors improves olfactory discrimination in adult rats. *Behav Neurosci*. 120 (1): 173-179.
- Mandaïron N, Didier A, Linster C (2008) Odor enrichment increases interneurons responsiveness in spatially defined regions of the olfactory bulb correlated with perception. *Neurobiol Learn Mem*. 90:178–184.
- Martin C, Gervais R, Hugues E, Messaoudi B, Ravel N (2004) Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: a correlate of odor recognition? *J Neurosci*. 24(2):389-97.
- 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, 218.
- Martončíková M, Lievajová K, Orendáčová J, Blaško J, Račeková E (2011) Odor enrichment influences neurogenesis in the rostral migratory stream of young rats. *Acta histochemica*. 113: 326-332.
- Meister M, Bonhoeffer T (2001) Tuning and topography in an odor map on the rat olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience*. 27 (4) 1351-1360.
- Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675-686.
- Mombaerts P (2006) Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:713-737.
- Monjarez-Fuentes F, Millán-Adalco D, Palomero-Rivero M, Hudson R, Drucker-Colín R (2017) Recovery of glomerulas morphology in the olfactory bulb of Young mice after disruption caused by continuous odorant exposure. *Bran Research*: 6-13.

- Mori K (2014) The olfactory system: From odor molecules to motivational behaviors. Japan Springer.
- Moucha R, Pandya PK, Engineer ND, Rathbun DL, Kilgard MP (2005) Background sounds contribute to spectrotemporal plasticity in primary auditory cortex. *Exp Brain Res.* 4:417-427.
- Nagayama S, Homma R, Imamura F (2014) Neuronal organization of olfactory bulbs. *Front Neural Circuits.* 3:8
- Neville KR, Haberly LB (2003) Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J Neurophysiol.* 90(6):3921-30.
- Nieto-Posadas A, Flores-Martinez E, Lorea-Hernández JJ, Rivera-Angulo AJ, Pérez-Ortega JE, Bargas J, Peña-Ortega F (2014) Change in network connectivity during fictive-gasping generation in hypoxia: prevention by a metabolic intermediate. *Front Physiol.* 23; 5:265.
- Nishizumi H, Sakano H (2015) Developmental regulation of neural map formation in the mouse olfactory system. *Dev Neurobiol.* 75(6):594-607.
- Nunes D, Kuner T (2015) Disinhibition of olfactory bulb granule cells accelerates odour discrimination in mice. *Nat Commun.* 6:8950.
- Neville KR, Haberly LB (2003) Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J Neurophysiol* 90:3921-3930.
- Ojeda SJ, De la Escalera JM (2004) España: Elsevier Medical, 308 pp.
- Onnela et al. (2005) *Phys Rev E* 71:065103.
- Pinching A, Powell T (1971a). The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J. Cell Sci.* 9: 305–345.
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101, 815–850.

- Peña 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*. 1:78-96.
- Peña-Ortega F (2013) Amyloid Beta-Protein and Neural Network Dysfunction. *Journal of Neurodegenerative Diseases*. 2013:8.
- Pérez-Ortega J (2016) Características fisiopatológicas de la enfermedad de Parkinson y la discinesia en el conectoma funcional del microcircuito estriatal. Instituto de Fisiología celular. Departamento de Neurociencia cognitiva. UNAM. 1-104.
- Pérez-Ortega J, Duhne M, Lara-González E, Plata V, Gasca D, Galarraga E, Hernández-Cruz A, Bargas J (2016). Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiology of disease*, 91, 347-361.
- Petrovic M, Schmucker D (2015) Axonal wiring in neural development: Target-independent mechanisms help to establish precision and complexity. *Bioessays*. 7(9):996-1004.
- Phillips ME, Sachdev RNS, Willhite DC, Shepherd GM (2012) Respiration drives network activity and modulates synaptic and circuit processing of lateral inhibition in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(1), 85–98.
- Pimentel-Farfán AK (2016) Prevención de los efectos del péptido  $\beta$ -amiloide in vitro por el enriquecimiento olfatorio. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Hall W, Lamantia S, Mcnamara J, Williams M (2008) *Neurociencia*. 3ª edición. España. Ed. Panamericana.
- Rabin M (1988) Experience facilitates olfactory quality discrimination. *Perception and Psychophysics*, 44, 532–540.
- Rall W, Shepherd GM (1968) Theoretical reconstruction dendrodendritic of field potentials and in olfactory bulb synaptic interactions. *J Neurophysiol*. 31:884-915.

- Rao PV, Gan SH (2014) Cinnamon: a multifaceted medicinal plant. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014:642942.
- Ravel N, Chabaud P, Martin C, Gaveau V, Hugues E, Tallon-Baudry C, Bertrand O, Gervais R (2003) Olfactory learning modifies the expression of odour-induced oscillatory responses in the gamma (60-90 Hz) and beta (15-40 Hz) bands in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 17:350-358.
- Riera C E, Tsaousidou E, Halloran J, Follett P, Hahn O, Pereira M M, ... & Brönneke, H (2017). The sense of smell impacts metabolic health and obesity. *Cell metabolism*, 26(1), 198-211.
- Rojas-Libano D, Kay L (2008) Olfactory system gamma oscillations: the physiological dissection of a cognitive neural system. *Cogn Neurodyn.* 3:179-194.
- Rojas-Líbano D, Frederick DE, Egaña JI, Kay LM (2014) The olfactory bulb theta rhythm follows all frequencies of diaphragmatic respiration in the freely behaving rat. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 214.
- Rosero MA, Aylwin ML (2011) Sniffing shapes the dynamics of olfactory bulb gamma oscillations in awake behaving rats. *Eur J Neurosci.* 34(5):787-99.
- Royet J, Souchier F, Jourdan F, Ploye H (1988) Morphometric study of the glomerular populations in the mouse olfactory bulb: Numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *The Journal of comparative neurology.* 270: 559-568.
- Rocheffort C, Gheusi G, Vincent J, Lledo P (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J of Neurosci.* 22 (7): 2679-2689.
- Rosselli-Austin L, Williams J (1990) Enriched neonatal odor exposure leads to increased numbers of olfactory bulb mitral and granule cells. *Dev Brain Res.* 51:135–137.
- Rubin BD, Katz LC (1999) Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 23:499-511

- Rubinov M, Sporns O (2010) Complex network measures of brain connectivity: Uses and interpretations. *NeuroImage* 52:1059-69.
- Serizawa S, Miyamichi K, Takeuchi H, Yamagishi Y, Suzuki M, Sakano H (2006) A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell*. 127 (5): 1057-1069.
- Schoenfeld T, Marchand J, Macrides F (1985) Topographic organization of tufted cell axonal projections in the hamster main olfactory bulb: an intrabulbar associational system. *J Comp Neurol*. 235: 503–518.
- Schoppa NE, Westbrook GL (2001) Glomerulus-specific synchronization of mitral cells in the olfactory bulb. *Neuron* 31:639-651.
- Schoppa NE, Urban NN (2003) Dendritic processing within olfactory bulb circuits. *Trends Neurosci* 26:501-506.
- Shapiro L, Ng K, Zhou Q, Ribak C (2007) Olfactory enrichment enhances the survival of newly cortical neurons in adult mice. *Sensory and motor system*. 18 (10): 981 -985.
- Shepherd G (1972) Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiological Reviews*. 52 (4), 54.
- Shepherd G, Greer C (1990) Olfactory bulb. In G. M. Shepherd (Ed.), *The synaptique organization of the brain*. New York: Oxford University Press.
- Shepherd GM, Chen WR, Greer CA (2004) Olfactory bulb. In: *The Synaptic Organization of the Brain*, 5th edn (Shepherd GM, Ed.). Oxford, New York, 165–216
- Singh G, Maurya S, DeLampasona MP, Catalan CA (2007) A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol*. 9: 1650-1661.
- Spors H, Wachowiak M, Cohen LB, Friedrich RW (2006) Temporal Dynamics and Latency Patterns of Receptor Neuron Input to the Olfactory Bulb. *J Neurosci*. 26(4):1247-59.
- Sporns O (2011) *Networks of the brain*. MIT Press.

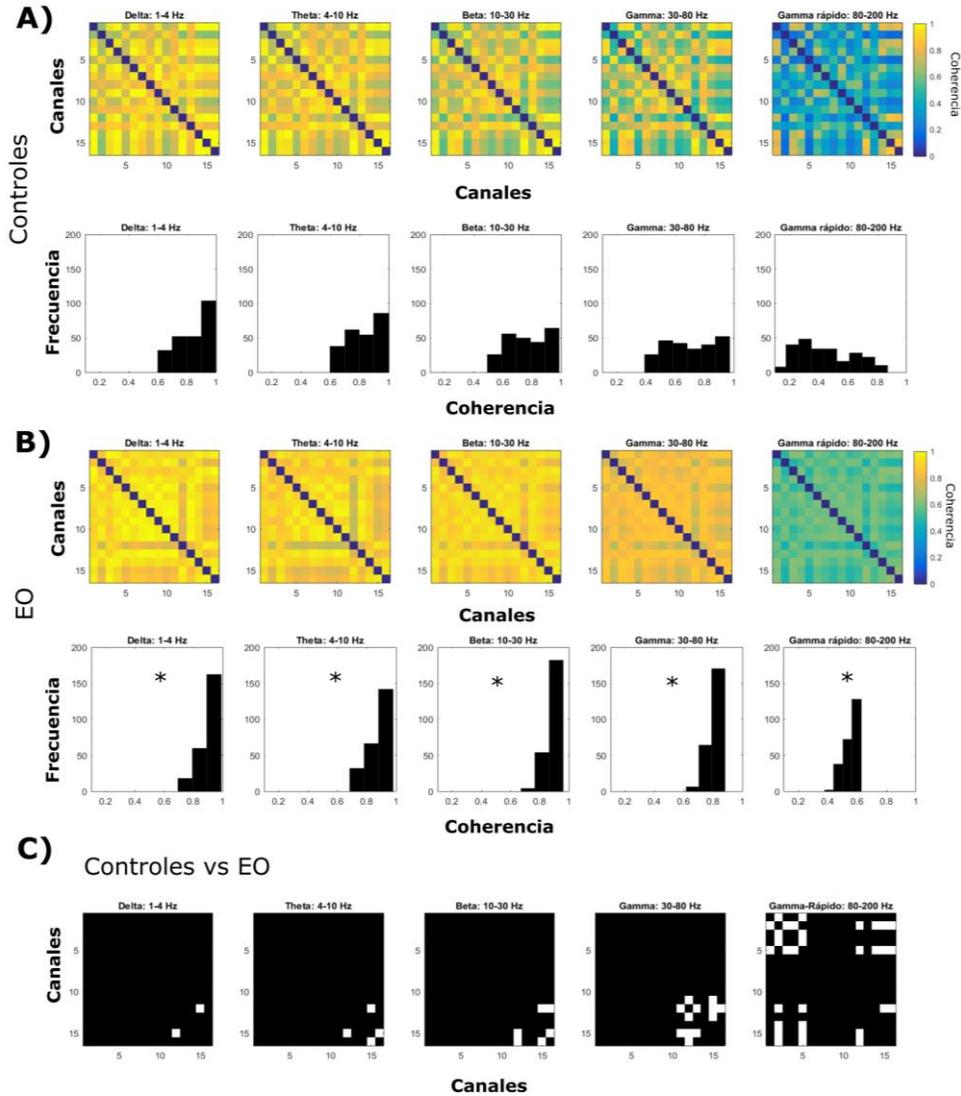
- Su CY, Menuz K, Carlson JR (2009) Olfactory perception: receptors, cells and circuits. *Cell*. 131 (1): 45-59
- Sun QQ (2009) Experience-dependent intrinsic plasticity in interneurons of barrel cortex layer IV. *J Neurophysiol*. 2009. 102(5):2955-73.
- Suarez N, Gil-Carcedo García LM (2007) Tratado de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. Ed. Medica Panamericana. 617p.
- Todrank J, Heth G, Restrepo D (2011) Effects of in utero odorant exposure on neuroanatomical development of the olfactory bulb and odour preferences. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1714), 1949–1955.
- Tong MT, Peace ST & Cleland TA (2014). Properties and mechanisms of olfactory learning and memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 238.
- Treloar, H.B., Purcell, A.L., Greer, C.A. (1999). Glomerular formation in the developing rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol*. 413 (2), 289–304.
- Turner CA, Yang MC, Lewis MH (2002) Environmental enrichment: effects on stereotyped behavior and regional neuronal metabolic activity. *Brain Res*. 938(1-2): 15-21.
- Uchida N, Takahashi YK, Tanifuji M, Mori K (2000) Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nat Neurosci* 3:1035-1043.
- Uhlhaas PJ1, Singer W. (2006) Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology. *Neuron*. 52(1):155-68.
- Valle-Leija P, Blanco-Hernández E, Drucker-Colín R, Gutiérrez-Ospina G, Vidaltamayo R (2012) Supernumerary formation of olfactory glomeruli induced by chronic odorant exposure: A constructivist expression of neural plasticity. *Plos One*. 7(4):e35358.
- Vincis R, Gschwend O, Bhaukaurally K, Beroud J, Carleton A. (2012) Dense representation of natural odorants in the mouse olfactory bulb *Nat Neurosci*. 15(4):537-9.

- 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 (3): 786-795.
- Wallace MB, Wax A, Roberts DN, Graf RN (2009) Espectroscopía de Reflectancia. *Clínicas de Endoscopia Gastrointestinal de América del Norte*, 19 (2), 233-242.
- Watts DJ, Strogatz SH. (1998) Collective dynamics of 'small-world' networks. *Nature*. 393:440–442.
- Welsch U (2006) *Histología*. Editorial Médica Panamericana. España. 688 p.
- Wesson DW, Levy E, Noxon R, Wilson D (2010) Olfactory dysfunction correlates with amyloid beta burden in an Alzheimer disease model. *Journal of Neuroscience*. 30:2
- Wilson DA, Sullivan RM, León M (1987) Single-unit analysis of postnatal olfactory learning: modified olfactory bulb output response patterns to learned attractive odors. *J. Neurosci*. 7:3154–3162.
- Wilson DA, Sullivan RM (2011). Cortical processing of odor objects. *Neuron*, 72(4), 506–519. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.027>.
- Wilson DA, Stevenson, RJ (2003). The fundamental role of memory in olfactory perception. *Trends in Neurosciences*. 26(5): 243-247.
- Wilson-Pauwels. (2013) *Nervios craneales: Nervio olfatorio*. Editorial Panamericana.
- Wilson CD, Serrano GO, Koulakov AA, Rinberg D (2017) A primacy code for odor identity. *Nature Communications*, 8, 1477.
- Wisden W, Laurie DJ, Monyer H, Seeburg PH (1992) The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J. Neurosci*. 12, 1040–1062.
- Yang X, Renken R, Hyder F, Siddeek M, Greer CA, Shepherd GM, Shulman RG (1998) Dynamic mapping at the laminar level of odor-elicited responses in rat olfactory bulb by functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7715-7720.
- Yang M, Crawley JN (2009) Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr Prot Neuro*.

- Zepeda, A., Arias, C., and Sengpiel, F. (2004). Optical imaging of intrinsic signals: recent developments in the methodology and its applications. *J. Neurosci. Methods* 136, 1–21.
- Zhang X, Firestein S (2002) The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci* 5:124-133.
- Zhang X, Rodriguez I, Mombaerts P, Firestein S (2004) Odorant and vomeronasal receptor genes in two mouse genome assemblies. *Genomics* 83:802-811.
- Zou J, Wang W, Pan YW, Lu S, Xia Z (2015) Methods to measure olfactory behavior in mice. *Curr Protoc Toxicol.* 63:18-21.
- Zhou S, Migliore M, Yu Y (2016) Odor Experience Facilitates Sparse Representations of New Odors in a Large-Scale Olfactory Bulb Model. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10, 10.
- Zhou Z, & Belluscio L (2012). Coding Odorant Concentration Through Activation Timing Between the Medial and Lateral Olfactory Bulb. *Cell Reports*, 2(5), 1143–1150.
- Zhou Y, Fang F, Pan P, Liu Z, Ji Y (2017) Visual deprivation induce cross-modal enhancement of olfactory perception. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 486: 833-838.

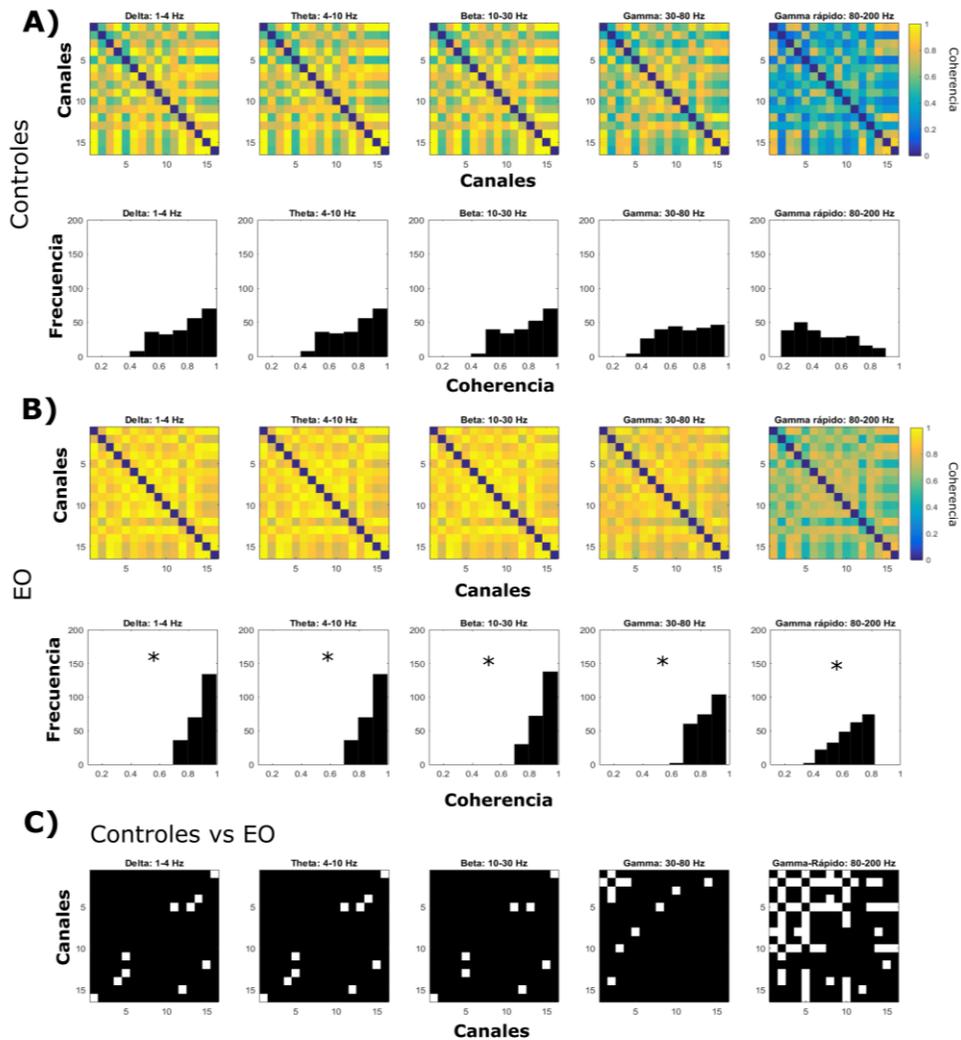
## 12. ANEXOS

### 12.1 Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la coherencia de la actividad eléctrica bulbar espontánea.



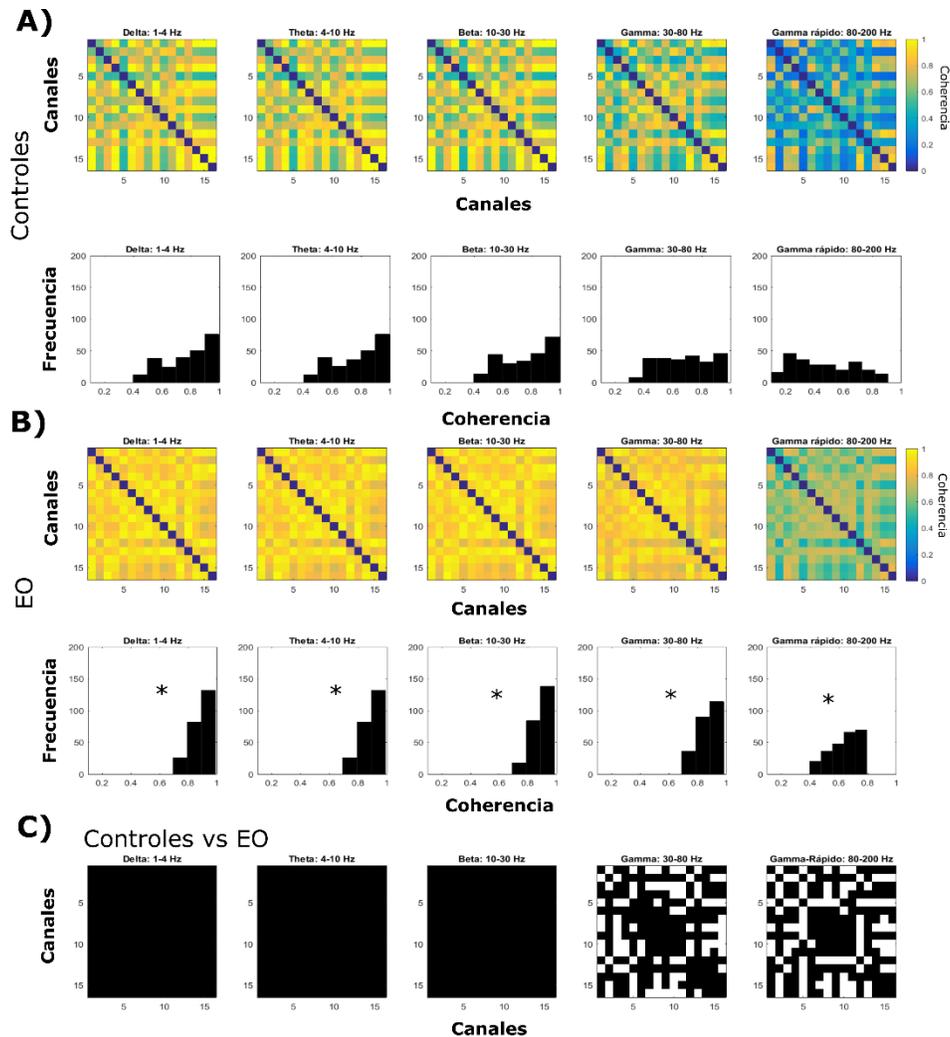
**Figura 26. Coherencia intrabulbar de las oscilaciones espontáneas poblacionales en distintas bandas de frecuencia en animales control (A) y EO (B).** Se muestran matrices de coherencia (en escala de color), en todas las bandas de frecuencia y de todos los electrodos localizados en el BOP. Note un incremento en la coherencia para todas las bandas de frecuencia en los animales EO. En (C) se muestra una matriz de significancia de las coherencias comparadas entre los dos grupos experimentales (U de Mann Whitney). Las celdas en blanco indican que un valor de  $p < 0.05$ . Note que las diferencias significativas en las coherencias son más comunes en las bandas de frecuencia rápidas. Se muestran también histogramas de frecuencia de los valores de coherencia de todo el circuito bulbar para cada banda de frecuencia. \* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

12.2 Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la coherencia de la actividad eléctrica bulbar inducida con acetato de amilo al 99%.



**Figura 27. Coherencia intrabulbar de las oscilaciones poblacionales inducidas por acetato de amilo al 99% en distintas bandas de frecuencia en animales control (A) y EO (B).** Se muestran matrices de coherencia (en escala de color), en todas las bandas de frecuencia y de todos los electrodos localizados en el BOP. Note un incremento en la coherencia para todas las bandas de frecuencia en los animales EO. En (C) se muestra una matriz de significancia de las coherencias comparadas entre los dos grupos experimentales (U Mann Whitney). Las celdas en blanco indican un valor de  $p < 0.05$ . Note que las diferencias significativas en las coherencias son más comunes en las bandas de frecuencia rápidas. Se muestran también histogramas de frecuencia de los valores de coherencia de todo el circuito bulbar para cada banda de frecuencia. \* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

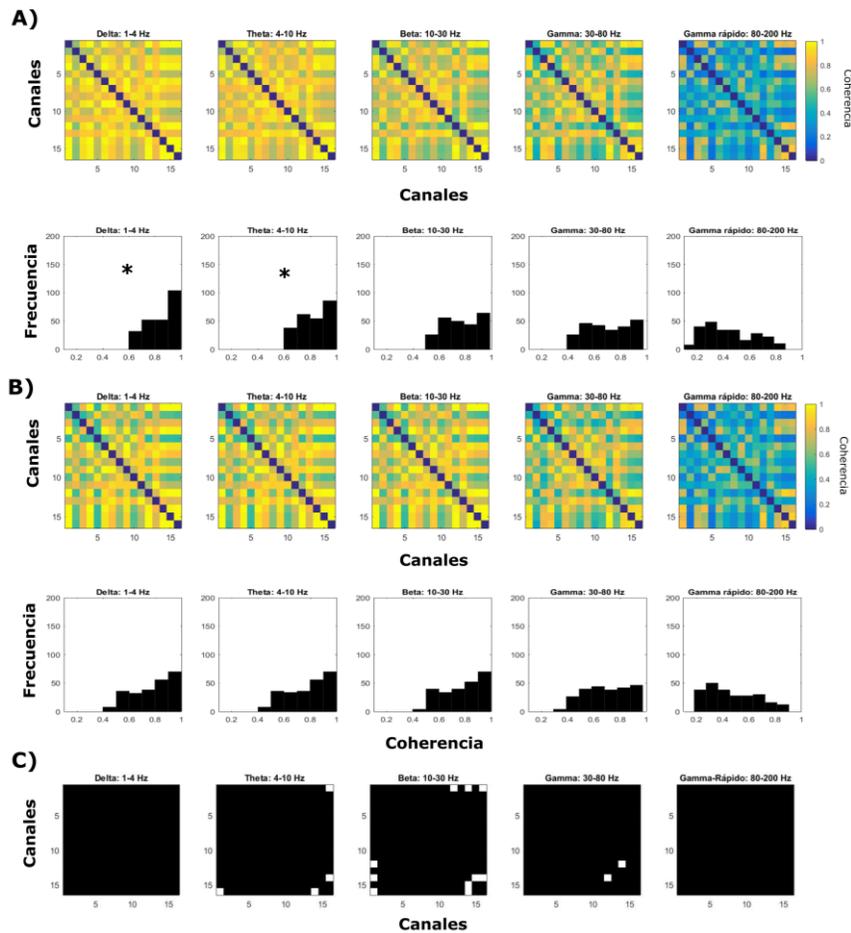
12.3 Efecto del enriquecimiento olfatorio sobre la coherencia de la actividad eléctrica bulbar inducida con esencia de canela.



**Figura 28. Coherencia intrabulbar de las oscilaciones poblacionales inducidas por esencia de canela en distintas bandas de frecuencia en animales control (A) y EO (B).** Se muestran matrices de coherencia (en escala de color), en todas las bandas de frecuencia y de todos los electrodos localizados en el BOP. Note un incremento en la coherencia para todas las bandas de frecuencia en los animales EO. En (C) se muestra una matriz de significancia de las coherencias comparadas entre los dos grupos experimentales (U Mann Whitney). Las celdas en blanco indican un valor de  $p < 0.05$ . Note que las diferencias significativas en las coherencias son más comunes en las bandas de frecuencia rápidas. Se muestran también histogramas de frecuencia de los valores de coherencia de todo el circuito bulbar para cada banda de frecuencia. \* denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

## 12.4 Efecto de la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99% sobre la coherencia de la actividad eléctrica bulbar en animales control.

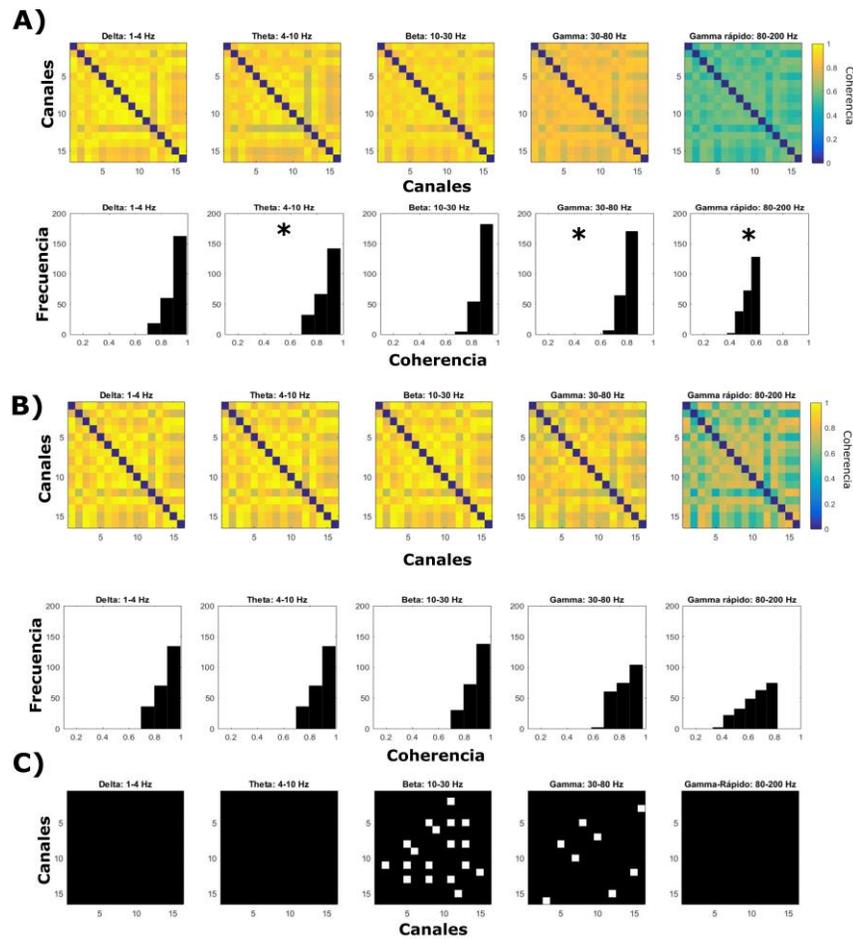
Con la finalidad de evaluar los cambios en las interacciones entre las distintas capas del BOP en los animales control tras la estimulación con acetato de amilo al 99%, evaluamos la actividad sincronizada intrabulbar mediante un análisis de coherencia del LFP de cada uno de los electrodos situados en el BOP con respecto a los demás. Los resultados indican un incremento significativo con respecto a la coherencia de la actividad espontánea sólo en las bandas delta (1-4 Hz) y theta (4-10 Hz), ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ; U Mann Whitney, Anexos: Figura 28 A-B, histogramas). No se reportan diferencias significativas en el resto de las bandas de frecuencia analizadas ( $p > 0.05$ ,  $n=6$ ; U Mann Whitney, Anexos: Figura 28 A-B, histogramas).



**Figura 29. Efecto de la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99% (B) sobre la coherencia intrabulbar de las oscilaciones espontáneas (A) en distintas bandas de frecuencia en animales control.** Se muestran matrices de coherencia (en escala de color) en todas las bandas de frecuencia y de todos los electrodos localizados en el BOP. Note un incremento en la coherencia para todas las bandas de frecuencia en los animales control. En (C) se muestran una matrices de significancia de las coherencias comparadas entre las dos condiciones (espontánea vs acetato de amilo al 99%- U de Mann Whitney). Las celdas en blanco indican que un valor de  $p < 0.05$ . Note que las diferencias significativas en las coherencias son más comunes en las bandas de frecuencia theta (4-10 Hz), beta (10-30 Hz) y gamma (30-80 Hz). Para ambas condiciones (espontánea y acetato de amilo al 99%) se muestran en histogramas los valores de coherencia de todo el circuito bulbar para cada banda de frecuencia. \* denota una diferencia significativa con respecto de la estimulación con acetato de amilo al 99% ( $p < 0.05$ ). Note un incremento de la coherencia total en las bandas delta (1-4 Hz) y theta (4-10 Hz) después de la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99%.

## 12.5 Efecto de la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99% sobre la coherencia de la actividad eléctrica bulbar en animales enriquecidos olfatoriamente.

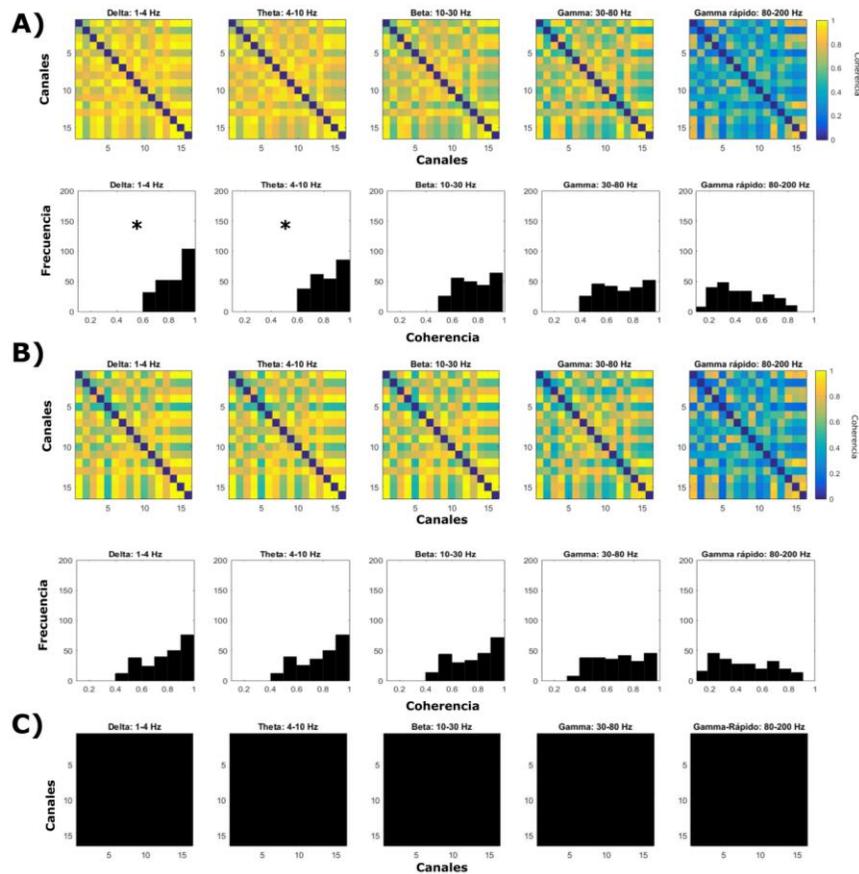
Con la finalidad de evaluar los cambios en las interacciones entre las distintas capas del BOP en los animales enriquecidos con aromas tras la estimulación con acetato de amilo al 99%, evaluamos la actividad sincronizada intrabulbar mediante un análisis de coherencia del LFP de cada uno de los electrodos situados en el BOP con respecto a los demás. Los resultados muestran un incremento significativo con respecto de la actividad espontánea en las bandas theta (4-10 Hz), gamma (30-80 Hz) y gamma rápido (80-200 Hz), ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ; U Mann Whitney; Anexos: Figura 29 A-B, histogramas). No se encontraron diferencias significativas en las bandas de frecuencia delta (1-4 Hz) y beta (10-30 Hz), ( $p > 0.05$ ,  $n=6$ ; U Mann Whitney, Anexos: Figura 29 A-B, histogramas).



**Figura 30. Efecto de la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99% (B) sobre la coherencia intrabulbar de las oscilaciones espontáneas (A) en distintas bandas de frecuencia en animales EO.** Se muestran matrices de coherencia (en escala de color) en todas las bandas de frecuencia y de todos los electrodos localizados en el BOP. Note un incremento en la coherencia para todas las bandas de frecuencia en los animales EO. En (C) se muestran matrices de significancia de las coherencias comparadas entre las dos condiciones (espontánea vs acetato de amilo al 99%; U de Mann Whitney). Las celdas en blanco indican que un valor de  $p < 0.05$ . Note que las diferencias significativas en las coherencias son más comunes en las bandas de frecuencia rápidas. Para ambas condiciones (espontánea y acetato de amilo al 99%) se muestran histogramas de los valores de coherencia de todo el circuito bulbar para cada banda de frecuencia. \* denota una diferencia significativa con respecto de la estimulación con acetato de amilo al 99% ( $p < 0.05$ ). Note un incremento de la coherencia total en las bandas theta (4-10 Hz), gamma (30-40 Hz) y gamma rápido (80-200 Hz) después de la estimulación olfatoria con acetato de amilo al 99%.

## 12.6 Efecto de la estimulación olfatoria con esencia de canela sobre la coherencia de la actividad eléctrica bulbar en animales control.

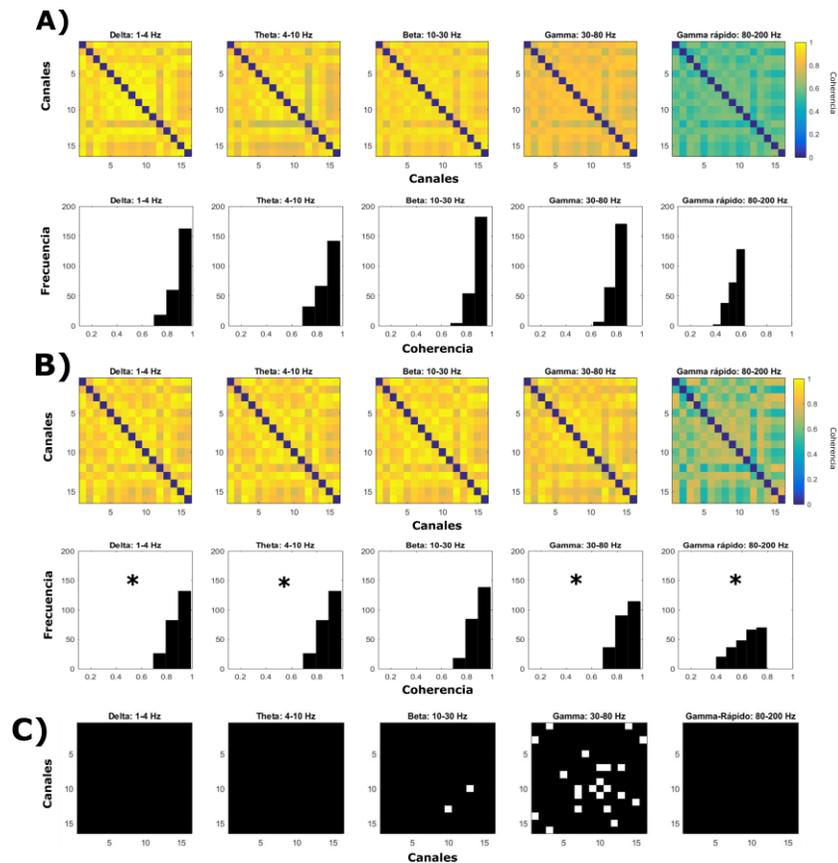
Con la finalidad de evaluar los cambios en las interacciones entre las distintas capas del BOP en los animales control tras la estimulación con esencia de canela, evaluamos la actividad sincronizada intrabulbar mediante un análisis de coherencia del LFP de cada uno de los electrodos situados en el BOP con respecto a los demás. Los resultados muestran una disminución significativa con respecto de la actividad espontánea sólo en las bandas delta (1-4 Hz) y theta (4-10 Hz), ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ , U Mann Whitney, Anexos: Figura 30 A-B, histogramas). No se reportan diferencias significativas en el resto de las bandas de frecuencia analizadas ( $p > 0.05$ ,  $n = 6$ ; U Mann Whitney, Anexos: Figura 30 A-B). Tampoco se encontraron diferencias significativas en las comparaciones realizadas por cada electrodo tras la estimulación con esencia de canela ( $p > 0.05$ ,  $n = 6$ ; U Mann Whitney, Anexos: Figura 30 C).



**Figura 31. Efecto de la estimulación olfatoria con esencia de canela (B) sobre la coherencia intrabulbar de las oscilaciones espontáneas (A) en distintas bandas de frecuencia en animales control.** Se muestran matrices de coherencia (en escala de color) en todas las bandas de frecuencia y de todos los electrodos localizados en el BOP. Note un incremento en la coherencia para todas las bandas de frecuencia en los animales control. En (C) se muestran matrices de significancia de las coherencias comparadas entre las dos condiciones experimentales (espontánea vs canela; U Mann Whitney). No se reportan diferencias significativas en ninguna comparación entre electrodos ( $p > 0.05$ ; U Mann Whitney). Para ambas condiciones (espontánea y canela) se muestran los valores de coherencia de todo el circuito bulbar para cada banda de frecuencia. \* denota una diferencia significativa con respecto de la estimulación con esencia de canela ( $p < 0.05$ ). Note un incremento de la coherencia total en las bandas delta (1-4 Hz) y theta (4-10 Hz) después de la estimulación olfatoria con esencia de canela.

## 12.7 Efecto de la estimulación olfatoria con esencia de canela sobre la coherencia de la actividad eléctrica bulbar en animales enriquecidos olfatoriamente.

Con la finalidad de evaluar los cambios en las interacciones entre las distintas capas del BOP en los animales control tras la estimulación con esencia de canela, evaluamos la actividad sincronizada intrabulbar mediante un análisis de coherencia del LFP de cada uno de los electrodos situados en el BOP con respecto a los demás. Los resultados muestran un incremento significativo con respecto de la actividad espontánea en las bandas delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), gamma (30-80 Hz) y gamma rápido (80-200 Hz), ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ; U Mann Whitney, Anexos: Figura 31 A-C). No se encontraron diferencias significativas en la banda de frecuencia beta (10-30 Hz), ( $p > 0.05$ ,  $n=6$ ; U Mann Whitney, Anexos: Figura 31 A-C). A diferencia de los animales control, la estimulación con esencia de canela si indujo un incremento en la coherencia de electrodos superficiales y profundos, presumiblemente ubicados en la capa glomerular y granular del BOP, en las bandas de frecuencia beta (10-30 Hz) y gamma (30-80 Hz), ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ; U Mann Whitney, Anexos: Figura 31 A-C). No se encontraron diferencias significativas en el resto de las bandas de frecuencia ( $p > 0.05$ ,  $n=6$ ; U Mann Whitney, Anexos: Figura 31 C).



**Figura 32.** Efecto de la estimulación olfatoria con esencia de canela (B) sobre la coherencia intrabulbar de las oscilaciones espontáneas (A) en distintas bandas de frecuencia en animales EO. Se muestran matrices de coherencia (en escala de color) en todas las bandas de frecuencia y de todos los electrodos localizados en el BOP. Note un incremento en la coherencia para todas las bandas de frecuencia en los animales EO. En (C) se muestran matrices de significancia de las coherencias comparadas entre las dos condiciones (espontánea vs canela; U Mann Whitney) dos grupos experimentales (U de Mann Whitney). Las celdas en blanco indican que un valor de  $p < 0.05$ . Note que las diferencias significativas en las coherencias son más comunes en las bandas de frecuencia beta (10-30 Hz) y gamma (30-80 Hz). Para ambas condiciones (espontánea y canela) se muestran en histogramas los valores de coherencia de todo el circuito bulbar para cada banda de frecuencia. \* denota una diferencia significativa con respecto de la estimulación con esencia de canela ( $p < 0.05$ ). Note un incremento de la coherencia total en las bandas delta (1-4 Hz), theta (4-10 Hz), gamma (30-80 Hz) y gamma rápido (80-200 Hz) después de la estimulación olfatoria con esencia de canela.